

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



FACTORES GENÉTICOS MODULADORES DO FENÓTIPO DA DREPANOCITOSE

Emanuel de Melo Cabaço Dias Ferreira

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



FACTORES GENÉTICOS MODULADORES DO FENÓTIPO DA DREPANOCITOSE

**Dissertação orientada pela Doutora Paula Faustino (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) e
pela Professora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa**

Emanuel de Melo Cabaço Dias Ferreira

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao Doutor João Lavinha, na qualidade de responsável pela Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e ao Professor Doutor José Pereira Miguel, presidente do Conselho Directivo do INSA, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Queria agradecer à Doutora Paula Faustino, na qualidade de orientadora externa, pela oportunidade que me concedeu de realizar este trabalho em colaboração com o Grupo de Investigação em Hemoglobinopatias, metabolismo do ferro e patologias associadas, pertencente à Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética do INSA. Queria agradecer pela sua disponibilidade em ajudar-me, pelo apoio e orientação nas actividades laboratoriais e na aquisição de conhecimentos teóricos durante este ano de formação.

Queria agradecer à Professora Deodália Dias por ter aceitado ser minha orientadora na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelo seu apoio ao longo do ano, pela sua inteira disponibilidade para me receber e aconselhar quando precisei.

Queria agradecer aos meus colegas do Grupo de Investigação em Hemoglobinopatias, Bruno Silva e Rute Martins pelo auxílio e aconselhamento na realização de diversas actividades laboratoriais. Agradeço em especial à Andreia Coelho por me ter dado formação laboratorial no início do estágio e pelo constante acompanhamento das minhas actividades laboratoriais ao longo do ano.

Queria agradecer à Isabel Picanço e à Dra Armandina Miranda por me terem proporcionado alguns conhecimentos de ordem teórica e prática em hemoglobinopatias.

Queria agradecer às médicas pediatras Dra Anabela Morais e Dra Alexandra Dias, respectivamente do Hospital de Santa Maria e do Hospital Fernando da Fonseca, pela colaboração na caracterização clínica dos doentes.

Queria agradecer ao Dr. Baltazar Nunes do Departamento de Epidemiologia do INSA pela colaboração na análise estatística dos resultados.

Queria agradecer aos doentes drepanocíticos pela disponibilidade em participarem neste estudo.

Queria, por fim, agradecer à minha namorada, à minha avó, à minha mãe e ao meu pai por todo o apoio e motivação que me deram para concluir o Mestrado.

Este projecto foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) – Projecto PIC/IC/83084/2007 e Financiamento Plurianual do Centro de Investigação em Genética Molecular Humana (CIGMH)

Resumo

A hemoglobina é uma proteína essencial, constituinte maioritário dos eritrócitos, cuja principal função é o transporte de oxigénio no organismo. Esta é constituída por quatro cadeias globínicas, cada uma ligada a um grupo heme, que contém um ião Fe^{2+} ao qual se liga uma molécula de O_2 .

As patologias associadas à hemoglobina (Hb) têm o nome genérico de hemoglobinopatias. Estas poderão ser do tipo quantitativo (as talassémias) ou qualitativo (as variantes da hemoglobina). De entre estas últimas salienta-se a mais comum, denominada Drepanocitose ou Anemia das células falciformes.

A Drepanocitose é uma doença autossómica recessiva, que se caracteriza pela presença em homozigotia de uma mutação de A > T no codão 6 de gene da beta-globina (*HBB*). Os doentes drepanocíticos são incapazes de sintetizar a hemoglobina predominante no adulto normal, a HbA. Pelo contrário, é sintetizada uma variante de hemoglobina, a HbS, que tem propriedades de falciformização no eritrócito e origina, consequentemente, eventos de vaso-oclusão e anemia hemolítica crónica. Embora a Drepanocitose seja uma doença monogénica, os seus fenótipos (hematológico e clínico) têm gravidade variável pois são modificados por vários factores ambientais e genéticos.

Este trabalho tinha como objectivos caracterizar uma população de 108 indivíduos para a presença da mutação drepanocítica, da deleção α -talassémica de 3,7 kb, quanto ao haplótipo no agrupamento génico β -globina e para uma série de polimorfismos em *BCL11A* e *HBS1L-MYB*. Seguidamente, pretendeu-se verificar se os genótipos caracterizados nestes *loci* seriam moduladores do nível de Hb Fetal (HbF; um parâmetro já aceite como sendo benéfico nesta patologia) e/ou do curso clínico da doença (medido através do número de crises de dor aguda que levaram a internamento dos doentes devidas, na sua maioria, à vaso-oclusão).

Verificou-se que a população drepanocítica analisada apresenta 29% de frequência alélica para a deleção α -talassémica de 3,7 kb. Observou-se que os indivíduos drepanocíticos que co-herdaram α -talassémia apresentam microcitose, hipocromia e níveis baixos de Hb total. Não foi encontrada associação entre presença da deleção de 3,7kb e o nível de HbF. No entanto, relativamente à relação entre a presença desta deleção e a gravidade da doença, observaram-se melhorias significativas nos heterozigóticos. Observou-se que os heterozigóticos para esta deleção tinham 29% menos risco de terem crises com internamento do que os homozigóticos e os que não co-herdaram α -talassémia apresentam apenas menos 12% de risco. Concluimos, portanto, que a co-herança da deleção α -talassémica de 3,7 kb confere um efeito benéfico quando em heterozigotia e um efeito nefasto quando em homozigotia.

Concluiu-se que a maior parte dos indivíduos apresentava o haplótipo Bantu no agrupamento génico da β -globina, seguido do Benim. Embora não se tendo observado associação entre o haplótipo e o nível de HbF, observou-se que, tendencialmente, a homozigotia para o haplótipo Bantu corresponde a níveis mais

baixos de HbF e a homozigotia para o haplótipo Senegal encontra-se, tendencialmente, associado a níveis elevados de HbF.

Não se verificou associação entre os polimorfismos globínicos, estudados na região promotora do gene γ -globina (rs112215533, rs112075505 e rs112479156) e o nível de HbF.

No que diz respeito aos polimorfismos em *BCL11A* (rs11886868, rs4671393, rs10189857 e rs45506594) verificaram-se associações estatisticamente significativas entre a presença dos alelos menos frequentes para os dois primeiros polimorfismos e o nível de HbF (respectivamente, $p = 0,001$ e $p < 0,001$). Observaram-se também melhorias do curso clínico da doença aquando da presença destes alelos. Relativamente ao SNP rs11886868, concluiu-se que os indivíduos heterozigóticos para o alelo mais raro (TC) tinham 36% menos risco de terem crises com internamento que os TT, enquanto que nos homozigóticos para esse alelo (CC) a melhoria ascendia a 62% menos de risco que os TT. Relativamente ao polimorfismo rs4671393 pôde constatar-se que a presença do alelo menos frequente em heterozigotia (AG) conferia a esses doentes 38% menos risco de terem crises com internamento que os GG, e que esse valor era de menos 60% para os AA, também relativamente aos GG.

No que se refere ao outro polimorfismo não globínico estudado, SNP rs9402686 em *HBS1L-MYB*, não se verificou associação com o nível de HbF.

Em conclusão, com este estudo conseguiram-se identificar dois polimorfismos (em *BCL11A*, SNP rs11886868 e rs4671393) associados a níveis de HbF mais elevados e a um curso clínico mais suave da drepanocitose, podendo assim ser utilizados como preditores precoces da gravidade da doença e para adequar a terapêutica às necessidades de cada doente.

Palavras chave: Drepanocitose, Alfa-talassémia, Hemoglobina fetal, Polimorfismos genéticos, Moduladores do fenótipo

Summary

Hemoglobin is an essential protein, and a major constituent of red blood cells, with its' main function being to transport oxygen in the organism. It is composed of four globin chains, each of which is linked to a heme group, which contains a Fe^{2+} ion that binds to a molecule of O_2 .

Hemoglobin associated pathologies are generically called hemoglobinopathies which can be of either a quantitative or qualitative type. One of the latter is Sickle Cell Anemia (SCA), a recessive autosomic disorder, characterized by the presence of a homozygous mutation A > T in codon 6 of the beta-globin gene (*HBB*). Individuals with SCA are unable to synthesize the predominant hemoglobin present in normal adults, HbA. Instead it is synthesized the variant HbS which leads to the sickling of red blood cells and therefore to vaso-occlusion events and chronic hemolytic anemia. Although Sickle Cell Anemia is a monogenic disease its hematological and clinical phenotypes have variable severity as they are modified by various environmental and genetic factors.

The objectives of this study were to characterize a population of 108 individuals, with sickle cell anemia, for the presence of the α -thalassemia deletion of 3.7 kb, the haplotype in the β -globin gene cluster and for a number of polymorphisms in the *BCL11A* and *HBS1L-MYB*. Next, the study sought to determine whether the genotypes at these *loci* were modulators of fetal Hb level (HbF; a parameter already accepted as being beneficial in this condition) and / or the clinical course of disease (measured by the number of crisis of acute pain which led to hospitalization of patients mostly as a consequence of vascular occlusion).

The analyzed population was found to have had an allelic frequency of 29% for α -thalassemia deletion of 3.7 kb. It was observed that those individuals with sickle cell Anemia who co-inherited α -thalassemia had microcytosis, hypochromia and low levels of total Hb. No association was found between the presence of the deletion of 3.7 kb and the level of HbF. However, on the relationship between the presence of this deletion and the severity of the disease, significant improvements were observed in the heterozygotes. It was observed that the heterozygotes for this deletion had 29% less likelihood of a crisis resulting in hospitalization than homozygotes, and those individuals who did not co-inherit α -thalassemia had only a 12% less risk. It was concluded, therefore, that the co-inheritance of α -thalassemia deletion of 3.7 kb confers a beneficial effect when heterozygous and an adverse effect when in homozygosity.

It was also concluded that most individuals had the Bantu haplotype in the of β -globin gene cluster, followed by the Benin haplotype. Whilst not having observed association between the haplotype and HbF level, a tendency was observed for the Bantu haplotype in homozygosity for lower levels of HbF and the Senegal haplotype in homozygosity, usually associated with high levels HbF. There was no association between polymorphisms studied in the promoter region of the γ -globin gene (rs112215533, and rs112075505 rs112479156) and the level of HbF.

In regards to the polymorphisms in *BCL11A* (rs11886868, rs4671393, rs10189857 and rs45506594) there were significant associations between the presence of less common alleles for the first two polymorphisms and the level of HbF (respectively, $p = 0.001$ and $p < 0.001$). There were also improvements in the clinical course of disease when these alleles were present. For the SNP rs11886868, it was concluded that heterozygous individuals for the rarest allele (CT) were 36% less likely to have crises with hospitalization than individuals with the TT genotype, whereas in homozygosity for this allele (CC) the improvement amounted to a 62% less risk. For the rs4671393 polymorphism it was seen that the presence of the less frequent allele in heterozygotes (AG) gave 38% of these patients less risk of seizures which required hospitalization than those individuals with the GG haplotype; the value was less than 60% for AA compared with the GG haplotype. As for the other non-globin polymorphism studied, SNP rs9402686 in *HBS1L-MYB*, no association with the level of HbF was found.

In conclusion, this study identified two polymorphisms (in *BCL11A*, rs11886868 and rs4671393 SNP) associated with higher levels of HbF and a milder clinical course of sickle cell disease, which can be used as early predictors of disease severity and to adjust the therapy to individual patient needs.

Key words: Sickle Cell Anemia, alpha-thalassemia, fetal hemoglobin, Genetic polymorphisms, Phenotype modulators

Abreviaturas

A	<u>A</u> denina
BCL11A	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma/ <u>l</u> eukemia
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine
C	<u>C</u> itosina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósidos trifosfatados
FOG	<u>F</u> riend <u>O</u> f <u>G</u> ata
G	<u>G</u> uanina
GWAS	<u>G</u> enome <u>W</u> ide <u>A</u> ssociation <u>S</u> tudies
Hb	<u>H</u> emoglobina
Hb F	<u>H</u> b <u>F</u> etal
HBB	<u>H</u> emoglobin <u>B</u> eta gene cluster
HBG	<u>H</u> emoglobin <u>G</u> amma gene cluster
HGM	<u>H</u> emoglobina <u>G</u> lobular <u>M</u> édia
HPFH	<u>H</u> ereditary <u>P</u> ersistence of <u>F</u> etal <u>H</u> emoglobin
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
HS	<u>H</u> yper <u>s</u> ensitive
Kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> ases
VGM	<u>V</u> olume <u>G</u> lobular <u>M</u> édio
Pb	<u>P</u> ares de <u>b</u> ases
QTL	<u>Q</u> uantitative <u>T</u> rait <u>L</u> ocus
LCR	<u>L</u> ocus <u>C</u> ontrol <u>R</u> egion
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PCV	<u>P</u> acked <u>C</u> ell <u>V</u> olume
NuRD	<u>N</u> ucleosome <u>R</u> emodeling and <u>H</u> istone <u>D</u> eacetylase
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
T	<u>T</u> imina
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus

Índice

I.	Introdução	1
1.1	Hemoglobina	1
1.1.1.	Estrutura da Hemoglobina.....	1
1.1.2.	Tipos de Hemoglobinas	1
1.1.3.	Síntese da Hemoglobina	2
1.1.3.1	Síntese da Hemoglobina ao longo do desenvolvimento	2
1.2.	Agrupamentos Génicos	3
1.2.1	Agrupamento génico β -globínico	3
1.2.2	Agrupamento génico α -globínico	3
1.3	Hemoglobinopatias	3
1.3.1	Drepanocitose	4
1.3.1.1	Manifestações clínicas.....	4
1.3.1.2	Componente molecular da doença	4
1.3.1.3	Fisiopatologia.....	4
1.3.1.4	Diagnóstico	5
1.3.1.5	A Drepanocitose em Portugal.....	5
1.4	Moduladores do fenótipo drepanocítico	6
1.4.1	Haplótipo	6
1.4.2	Alfa-talassémia	6
1.4.3	Hemoglobina Fetal	7
1.4.3.1	Factores genéticos moduladores do nível de HbF	8
1.4.3.1.1	<i>HBG2</i>	8
1.4.3.1.2	<i>BCL11A</i>	10
1.4.3.1.3	<i>HBS1L-MYB</i>	11
II.	Objectivos.....	13
III.	Material e Métodos.....	14
1.1	Material de estudo	14
1.2	Pesquisa da mutação drepanocítica.....	14
1.2.1	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	14
1.2.2	Restrição enzimática do DNA amplificado	15
1.3	Gap-PCR.....	15
1.4	PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>)	17

1.5	Purificação dos produtos de PCR para sequenciação	18
1.6	Sequenciação de DNA.....	18
1.7	Tratamento estatístico dos dados	19
IV.	Resultados e Discussão.....	21
1.1	Caracterização da população em estudo	21
1.2	Pesquisa da mutação drepanocítica.....	22
1.3	Pesquisa da deleção $-\alpha 3,7$ e relação com os níveis de HbF.....	22
1.3.1	Caracterização dos níveis de HGM, VGM e Hb Total.....	24
1.3.2	Relação entre a co-herança da Alfa-talassémia e o curso clínico da Drepanocitose	26
1.4	Caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina	28
1.4.1	Caracterização dos polimorfismos da região do promotor do gene γ -globina	32
1.5	Caracterização dos polimorfismos em <i>BCL11A</i>	35
1.5.1	Caracterização do polimorfismo rs11886868.....	35
1.5.2	Caracterização do polimorfismo rs4671393.....	38
1.5.3	Caracterização do polimorfismo rs10189857.....	41
1.6	Caracterização do polimorfismo em <i>HBS1L-MYB</i>	43
V.	Conclusões.....	45
VI.	Perspectivas futuras	47
VII.	Bibliografia.....	48
VIII.	Anexos	51
	Anexo I.....	51
	Anexo II.....	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura tridimensional da molécula da Hb.....	1
Figura 2 - Síntese dos vários tipos de hemoglobina ao longo do desenvolvimento	2
Figura 3 - Esquema representativo do agrupamento génico beta-globínico.....	3
Figura 4 - Esquema representativo do agrupamento génico alfa-globínico	3
Figura 5 - Ilustração de dois eritrócitos.....	5
Figura 6 – Representação esquemática da comutação génica globínica durante a vida fetal.	10
Figura 7 - Representação dos genes $\alpha 2$ - e $\alpha 1$ -globina e da deleção $-\alpha 3,7$	16
Figura 8 - Representação do gene híbrido $\alpha 2\alpha 1$ resultante da deleção $-\alpha 3,7$	17
Figura 9 - Representação dos polimorfismos no agrupamento génico β -globínico.....	18
Figura 10 – Gráfico onde está representada a distribuição da população por idade e por sexo.....	21
Figura 11 - Gel de electroforese de uma digestão com a enzima <i>Bsu</i> 36I	22
Figura 12 - Gel de electroforese de um Gap-PCR usado para detectar a deleção de 3,7 kb	23
Figura 13 – Gel de electroforese do fragmento amplificado da extremidade 3' do $\psi\beta$ -globina	28
Figura 14 - Gel de electroforese do fragmento amplificado da extremidade 5' do $\psi\beta$ -globina.....	28
Figura 15 - Gel de electroforese do fragmento amplificado da extremidade 5' do gene γ -globina.....	29
Figura 16 - Gel de electroforese do fragmento amplificado da extremidade 5' do gene δ -globina.....	29
Figura 17 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado a jusante do gene β -globina.....	29
Figura 18 - Sequenciação parcial do gene γ -globina com local polimórfico rs7482144.....	29
Figura 19 - Sequenciação parcial do promotor do gene γ -globina	32
Figura 20 - Gel de electroforese do fragmento do gene <i>BCL11A</i> na região do polimorfismo rs11886868	35
Figura 21 – Gráfico caixa de bigodes com a percentagem de HbF associada a cada genótipo rs11886868	36
Figura 22 - Gel de electroforese do fragmento do gene <i>BCL11A</i> na região do polimorfismo rs4671393	38
Figura 23 - Gráfico caixa de bigodes com a percentagem de HbF associada a cada genótipo rs4671393	39
Figura 24 – Sequenciação parcial do gene <i>BCL11A</i>	41
Figura 25 - Gel de electroforese do fragmento de <i>HBS1L-MYB</i> na região do polimorfismo rs9402686.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa a mutação β^s	15
Tabela 2 - Condições de PCR usadas para detecção da deleção $-\alpha 3,7$	16
Tabela 3 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo	23
Tabela 4 – Associação entre a percentagem de HbF e os genótipos da Alfa-talassémia.....	24
Tabela 5 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HGM, VGM e Hb total associados a cada genótipo	24
Tabela 6 – Associação entre o valor de HGM e os genótipos da Alfa-talassémia; comparações múltiplas	25
Tabela 7 - Associação entre o valor de VGM e os genótipos da Alfa-talassémia; comparações múltiplas	25
Tabela 8 - Associação entre o valor de Hb Total e os genótipos da Alfa-talassémia; comparações múltiplas .	26
Tabela 9 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada haplótipo	30
Tabela 10 - Associação entre o valor de HbF e os haplótipos no agrupamento génico da β -globina.....	31
Tabela 11 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs112215533	32
Tabela 12 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112215533	33
Tabela 13 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs112075505	33
Tabela 14 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112075505	34
Tabela 15 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs112479156	34
Tabela 16 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112479156	35
Tabela 17 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de 11886868	36
Tabela 18 – Associação entre o valor de HbF e os genótipos de rs11886868; comparações múltiplas	37
Tabela 19 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs4671393	39
Tabela 20 – Associação entre o valor de HbF e os genótipos de rs4671393; comparações múltiplas	40
Tabela 21 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs10189857	41
Tabela 22 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs10189857	42
Tabela 23 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs45506594	42
Tabela 24 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs45506594	43
Tabela 25 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo de rs9402686	44
Tabela 26 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs9402686	44
Tabela A.1 - Oligonucleótidos iniciadores usados para pesquisa da mutação β^2 e da deleção – alfa 3,7.....	51
Tabela A.2 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene G γ -globina para digestão com <i>Xmn</i> I. ..	51
Tabela A.3 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene G γ -globina para digestão com <i>Hind</i> III. 51	
Tabela A.4 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene A γ -globina para digestão com <i>Hind</i> III. 52	
Tabela A.5 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene $\Psi\beta$ -globina para digestão com <i>Hinc</i> II.. 52	
Tabela A.6 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene $\Psi\beta$ -globina para digestão com <i>Hinc</i> II.. 52	
Tabela A.7 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene β -globina para digestão com <i>Hinf</i> I	53

Tabela A.8 - Tamanhos dos fragmentos de DNA digeridos e não digeridos pelas respectivas enzimas.....	53
Tabela A.9 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento do <i>SNP</i> rs11886868.	53
Tabela A.10 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento do <i>SNP</i> rs10189857.	54
Tabela A.11 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento do <i>SNP</i> rs4671393.	54
Tabela A.12 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento do <i>SNP</i> rs9402686.	54
Tabela A.13 - Fragmentos obtidos após digestão dos fragmentos de rs11886868, rs4671393 e rs 9402686.	55
Tabela A.14 - Mistura e condições de PCR para sequenciação automática de DNA.	55
Tabela A.15 - Caracterização das população para alguns dos parâmetros analisados	55

I. Introdução

1.1 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína de 65 KDa, descoberta por Hünefeldt em 1840, cuja principal função é transportar o oxigénio dos pulmões para todos os tecidos do organismo. Após a sua libertação, este é usado pelas células no seu metabolismo e a Hb, na forma desoxigenada, capta o dióxido de carbono e transporta-o até aos pulmões.

A Hb está também envolvida no transporte de outros gases, como por exemplo, transporta o óxido nítrico ligado ao grupo tiol da proteína globínica, libertando-o conjuntamente com o oxigénio [1,2].

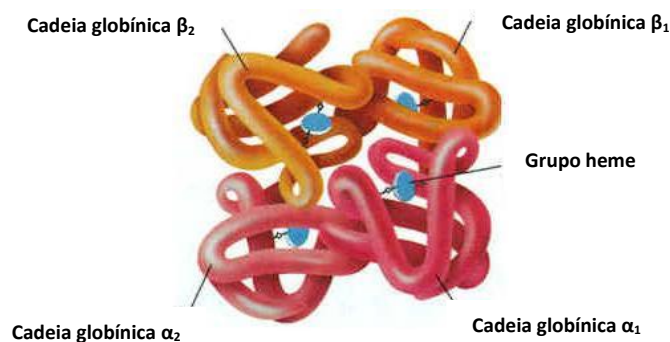


Figura 1 - Estrutura tridimensional da molécula da Hb, evidenciando o grupo heme. Adaptado de <http://doctorgrasshopper.wordpress.com/tag/hemoglobin/> [3].

1.1.1. Estrutura da Hemoglobina

A Hb é composta por quatro cadeias peptídicas (as globinas), cada uma delas ligada a um grupo heme, que por sua vez é constituído por um anel orgânico (porfirina) que tem no centro um grupo de ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}). A cada ião de ferro liga-se uma molécula de oxigénio, assim a cada molécula de Hb podem ligar-se 4 moléculas de oxigénio. A ligação do oxigénio à Hb ocorre de uma forma cooperativa, uma vez que a ocupação de um dos locais de ligação potencia a afinidade para outro local de ligação [2].

1.1.2. Tipos de Hemoglobinas

Cada molécula de Hb humana é constituída por 2 dímeros de cadeias globínicas, 2 do tipo α e 2 do tipo β . Existem vários tipos de hemoglobinas que diferem entre si na composição das cadeias globínicas. No adulto normal, a Hb predominante é a hemoglobina A, HbA ($\alpha_2\beta_2$) que representa cerca de 98% da Hb total; a HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) que representa os restantes 2-3%. Existe ainda a hemoglobina fetal, HbF ($\alpha_2\gamma_2$) que constitui 80% do total da Hb de um recém-nascido e diminui durante o 1º ano de vida do bebé, podendo permanecer em quantidades residuais nos adultos (0-2%) [1].

1.1.3. Síntese da Hemoglobina

A síntese da Hb é um processo complexo que ocorre durante a eritropoiese, nas células eritrocitárias precursoras desde o estadio de proeritroblasto até ao de reticulócito [4]. O grupo heme é sintetizado numa série de etapas na mitocôndria e no citosol dos referidos eritrócitos imaturos, enquanto que as globinas são sintetizadas pelos ribossomas no citosol.

1.1.3.1 Síntese da Hemoglobina ao longo do desenvolvimento

No embrião, são sintetizadas no saco vitelino hemoglobinas específicas deste estadio, a Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), a Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e a Portland ($\zeta_2\gamma_2$) que têm ainda uma afinidade mais elevada para o oxigénio que a HbA, e semelhante à HbF. Estas contêm cadeias globínicas que são sintetizadas em quantidades significativas apenas durante a vida embrionária, especialmente a zeta (ζ) e a épsilon (ϵ). Assim, por volta das 5 semanas após a concepção, as hemoglobinas Gower 1, Gower 2 e Portland são as hemoglobinas maioritárias no embrião. Contudo, ocorre nessa altura um fenómeno de comutação génica (*switching*), que envolve o silenciamento dos genes de expressão embrionária e a activação dos genes de expressão fetal. Ocorre um controlo transcripcional e pós-transcripcional que, consequentemente, leva ao término da síntese de ζ -globina e ao início da síntese de α -globina [5,6]. A síntese da HbF é então iniciada e por volta das 14 semanas após a concepção praticamente já só está presente a HbF. Após esta altura inicia-se a síntese da HbA [1,2] A HbA2 começa a ser sintetizada por volta das 30 semanas após a concepção e aumenta ligeiramente ao longo da vida, mantendo-se, no entanto, em níveis relativamente baixos. Os níveis de HbF diminuem bastante após o nascimento, continuando a diminuir durante o 1º ano de vida do bebé, permanecendo em níveis residuais na fase de adulto [1,6].

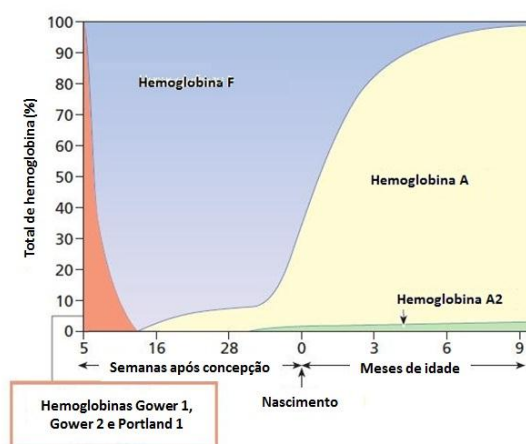


Figura 2 - Síntese dos vários tipos de hemoglobina ao longo do desenvolvimento. Adaptado de Bain *et al.* 2006 [1].

1.2 Agrupamentos Génicos

1.2.1 Agrupamento génico β -globínico

O agrupamento génico β -globínico, composto pelos genes ϵ -, $G\gamma$ -, $A\gamma$ -, $\psi\beta$ -, δ - e β -globina, transcritos nesta ordem de 5' para 3', situa-se no cromossoma 11 (11p15.5) [1]. A montante destes genes situa-se a região regulatória distal, a Região de Controlo do *Locus* (LCR), que desempenha um papel crucial na comutação dos genes deste agrupamento [5].

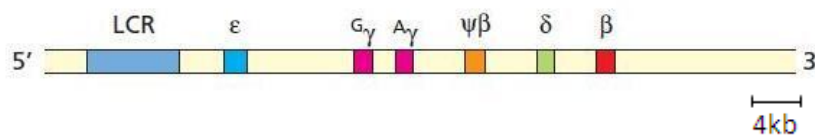


Figura 3 - Esquema representativo do agrupamento génico beta-globínico. Adaptado de Bain *et al.* 2006 [1].

1.2.2 Agrupamento génico α -globínico

O agrupamento génico α -globínico é composto pelos genes ζ -, $\psi\zeta$ -, $\psi\alpha 2$ -, $\psi\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 1$ -globina, transcritos nesta ordem de 5' para 3' e situa-se no cromossoma 16 junto ao telómero (16p13.3). A montante destes genes situa-se a região regulatória distal caracterizada por um conjunto de locais hipersensíveis à DNase I (HS). Destes salienta-se a HS-40, a região mais importante na regulação da transcrição génica deste agrupamento, mas também existem a HS-48, HS-40, HS-33 e HS-10. De notar que os genes são transcritos pela ordem apresentada, ao longo dos diferentes estadios do desenvolvimento dos indivíduos [1].

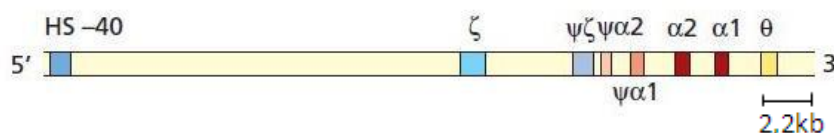


Figura 4 - Esquema representativo do agrupamento génico alfa-globínico Adaptado de Bain *et al.* 2006 [1].

1.3 Hemoglobinopatias

Hemoglobinopatias é o nome genérico atribuído às patologias associadas à síntese da hemoglobina. São doenças hereditárias de transmissão autossómica recessiva devidas a alterações nos genes globínicos, que podem dar origem a dois tipos de deficiência na sua expressão: quantitativa ou qualitativa. As primeiras caracterizam-se por uma síntese diminuída ou nula de uma cadeia globínica, originando patologias como por exemplo Alfa- ou Beta-talassémia. As segundas caracterizam-se pela síntese de variantes estruturais da hemoglobina, como por exemplo a Drepanocitose ou Anemia das Células Falciformes [1].

1.3.1 Drepanocitose

1.3.1.1 Manifestações clínicas

A Drepanocitose, também chamada Anemia das Células Falciformes, é uma hemoglobinopatia do tipo qualitativo, caracterizada por eventos de vaso-oclusão e anemia hemolítica crônica. Os eventos de vaso-oclusão despoletam isquemia nos tecidos, que por sua vez originam dores fortes, crônicas ou agudas, potencialmente em qualquer órgão do corpo incluindo os ossos, os pulmões, o fígado, os rins, os olhos, o cérebro e as articulações. A hemólise crônica pode levar a variados graus de anemia, icterícia, colelitíase, e atrasos ao nível do crescimento e maturação sexual. Indivíduos com um elevado grau de hemólise estão predispostos para a hipertensão arterial pulmonar, priapismo e úlceras nas pernas [7].

1.3.1.2 Componente molecular da doença

A Drepanocitose caracteriza-se pela predominância de uma variante da hemoglobina, a Hemoglobina S (HbS), que resulta da presença em homozigotia da mutação ($\text{GAG} > \text{GTG}$) no codão 6 do gene da β -globina (HBB:c.20A>T). Esta alteração provoca a substituição de um resíduo de ácido glutâmico por valina no sexto aminoácido da cadeia β -globínica. Os indivíduos homozigóticos para HbS não sintetizam cadeias β -globina normais (consequentemente têm completa ausência de HbA), apresentam como maior componente a HbS (cerca de 80%), uma pequena percentagem de HbA2 (1,6 a 3,6%) e uma proporção bastante variável de HbF [8].

Os indivíduos portadores de Drepanocitose (heterozigóticos) têm uma cópia do gene *HBB* com a mutação que dá origem à variante S e uma do gene da β -globina normal (apresentam níveis de HbS de cerca de 40%). Os indivíduos normais possuem duas cópias normais do gene da β -globina (ausência de HbS) [9].

Outras formas da doença – as síndromes drepanocíticas resultam da co-herança de HbS com outras anomalias da cadeia β -globínica, por exemplo, com β -talassémia ($\text{S}\beta^+$ -talassémia, em que há alguma síntese de HbA, e $\text{S}\beta^0$ -talassémia, em que não há síntese de HbA) ou com outras variantes de Hb: com HbC, HbD-Punjab, HbO-Arab, etc [8].

1.3.1.3 Fisiopatologia

A substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia globínica atribui-lhe uma nova propriedade: a sua polimerização induzida pela desoxigenação. A desoxi-HbS interage de uma forma hidrofóbica com as cadeias adjacentes e à medida que polimeriza e as fibras alinham, o eritrócito adquire a forma de uma “foice” e aumenta a sua capacidade de adesão ao endotélio. Estes eritrócitos deformados (chamados drepanócitos) são rígidos e podem obstruir o normal fluxo sanguíneo na micro-circulação e assim

induzir isquemia nos tecidos da periferia dos vasos, o que é a base da maior parte das complicações que advêm desta doença [10].

A formação das células em foice pode ser potenciada por factores ambientais, tais como a hipóxia, pH baixo, frio, desidratação dos eritrócitos e moléculas de adesão e citocinas associadas a infecções [11]. Por outro lado, pensa-se que a expressão aumentada de moléculas de adesão nos eritrócitos e células endoteliais, interações com leucócitos, níveis aumentados de citocinas inflamatórias na circulação, trombose microvascular potenciada, danos no endotélio, a rigidez e a forma dos eritrócitos possam contribuir para a obstrução das arteriolas pelos drepanócitos [12].



Figura 5 - Ilustração de dois eritrócitos, o da esquerda falciforme (drepanócito) e o da direita normal. Adaptado de: http://rappagemagazine.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1940:sickle-cell-what-african-americans-needs-to-know-&catid=52:mind-ya-business&Itemid=81 [13].

Dado que os fenótipos hematológicos e clínicos dos indivíduos homozigóticos para HbS são extremamente variáveis, podemos concluir que mesmo sendo a Drepanocitose uma doença de base monogénica, ao nível dos fenótipos é, muito provavelmente, uma doença multigénica [8].

1.3.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da Drepanocitose é estabelecido quando são detectadas quantidades significantes (cerca de 80-90%) de HbS no sangue periférico, através do uso de métodos laboratoriais comuns como focagem isoeléctrica, electroforese de hemoglobinas em acetato celulose, cromatografia líquida de elevada performance (HPLC); ou por detecção da mutação drepanocítica no DNA, através do uso de metodologias de biologia molecular [7].

1.3.1.5 A Drepanocitose em Portugal

Em Portugal a prevalência média de portadores de HbS é de 0,32%, atingindo os valores mais altos no distrito de Beja (1,1%), e em duas zonas, no vale do Tejo (Coruche) e vale do Sado (Alcácer do Sal) em que a prevalência é de 5-6%. Em regiões onde há muita imigração relativamente recente, provenientes dos PALOPs (por exemplo na periferia da grande Lisboa) a prevalência de portadores de HbS é também bastante elevada [14].

1.4 Moduladores do fenótipo drepanocítico

1.4.1 Haplótipo

Chama-se haplótipo à combinação de marcadores moleculares observada numa forma particular de um cromossoma. Enquanto que existem vários haplótipos para a região do agrupamento β -globina, nos cromossomas com a variante HbS, encontram-se predominantemente haplótipos específicos [9].

Foram descritos cinco haplótipos principais associados à mutação drepanocítica, nomeados de acordo com a região onde houve a recorrência mutacional (quatro vezes em África e uma na Ásia): Benim, Bantu, Camarões, Senegal e Asiático [15]. Os haplótipos do agrupamento β -globina estão associados a diferentes graus de gravidade das manifestações clínicas na Drepanocitose, sendo os haplótipos senegalense e arabo-indiano os menos graves e o haplótipo Bantu o mais grave [8,9]. Este facto dever-se-á provavelmente à variação na concentração de HbF, condicionada pela coexistência de vários polimorfismos que afectam motivos reguladores no interior ou na proximidade do gene da β -globina [9,16].

Estudos anteriormente realizados revelaram que na população portuguesa os haplótipos mais frequentes são o Bantu, o Benim e o Senegal, estando mais de 50% dos cromossomas β^S associados ao haplótipo Bantu. A distribuição destes haplótipos na população portuguesa leva a crer que tenha havido uma importação inicial do gene β^S da bacia do Mediterrâneo durante a ocupação Árabe nos séculos VII e XII, à qual parece estar associado o haplótipo Benim, e uma importação posterior, iniciada no séc. XV com o tráfico de escravos de África, que teria introduzido a mutação drepanocítica associada aos haplótipos Bantu e Senegal [15].

1.4.2 Alfa-talassémia

As α -talassémias são um grupo de patologias que resultam de uma síntese reduzida de α -globina, causada pela deleção ou disfunção de um, ou mais, dos quatro genes α -globina (*HBA*). Quando ambos os genes α -globina de um único cromossoma estão delecionados ou se a sua transcrição estiver completamente inactivada, origina-se uma patologia grave designada por α^0 -talassémia. Quando os genes ainda exercem alguma função e há alguma síntese de cadeias α -globina (por exemplo quando apenas um dos dois genes α num cromossoma está delecionado) a patologia designa-se por α^+ -talassémia e os sintomas são menos graves.

Uma α -talassémia de origem não delecional (causada por mutação pontual num gene) leva, normalmente, a uma α^+ -talassémia. Uma α -talassémia de origem delecional pode resultar tanto em α^0 ou α^+ talassémia, dependendo do tamanho e da natureza da deleção [1].

Os indivíduos que co-herdaram α -talassémia com Drepanocitose apresentam o fenótipo hematológico de microcitose e hipocromia, baixo VGM (volume globular médio) e HGM (hemoglobina globular média), típico da α -talassémia, conjuntamente com o fenótipo de Drepanocitose [17]

O efeito da co-herança da α -talassémia com a Drepanocitose é ainda controverso. Alguns autores salientam alguns factores benéficos visto que, nesta situação, há redução da concentração intracelular da HbS e, consequentemente, diminuição da sua polimerização e da anemia hemolítica. Este facto deve-se-á, em parte, à maior afinidade das cadeias α -globina (que neste caso se encontram em número reduzido) para as da β -globina normal (β^A -globina) do que para as cadeias mutadas (β^S -globina) [10,18]. É também observada uma diminuição acentuada do número médio de leucócitos e de reticulócitos em crianças drepanocíticas com α -talassémia, provavelmente devido à redução da taxa hemolítica. Esse facto deve-se, provavelmente, à redução do número de células falciformes irreversíveis bem como a uma possível diminuição no processo inflamatório o que poderá desempenhar um papel importante na diminuição da adesão dos eritrócitos às células endoteliais [10,19]. Para além disso, outros autores observam que a α -talassémia está também associada a uma diminuição da prevalência de acidentes vasculares cerebrais, de úlceras nas pernas e preservação da função do baço, talvez por causa de uma redução na hemólise e melhores níveis PCV (*Packed cell volume*) [8,19].

Por outro lado, a co-herança da α -talassémia com a Drepanocitose já foi reportada como tendo efeitos prejudiciais que se traduzem em complicações ligadas a um aumento da viscosidade do sangue, tais como agravamento dos episódios dolorosos e osteonecrose [9,19,20].

Neste trabalho investigou-se se os indivíduos da população em estudo eram α -talassémicos, através da pesquisa da deleção de 3,7 Kb que resulta da recombinação recíproca entre regiões altamente homólogas, chamadas caixas Z, formando-se um cromossoma com uma deleção de 3,7 kb ($-\alpha 3,7$ kb) contendo apenas um gene α -globina. Nesta recombinação é removida parte do gene $\alpha 2$ -globina e parte do $\alpha 1$ -globina, formando-se um gene híbrido $\alpha 2\alpha 1$ que resulta da fusão do que restou destes, mas que é funcional.

1.4.3 Hemoglobina Fetal

A HbF possui grande afinidade para o oxigénio e é um tipo de hemoglobina sintetizado predominantemente durante a gestação. Nos humanos, após o nascimento, ocorre a comutação da expressão génica de γ - para β -globina, levando à substituição da HbF pela HbA em circulação [16]. No entanto, a HbF continua a ser sintetizada em quantidades residuais ao longo da vida do adulto, sendo que a maioria dos adultos normais tem cerca 1% de HbF [21]. Há, contudo, alguns indivíduos que apresentam uma expressão anormalmente elevada da γ -globina no período adulto (e consequentemente nível elevado de HbF) o que está, por vezes, associada a deleções no agrupamento génico da β -globina ou a mutações pontuais a montante dos genes γ -globina [16]. No entanto, esta condição rara, denominada persistência

hereditária da hemoglobina fetal (HPFH), encontra-se apenas em 1 de cada 1000 numa população de indivíduos drepanocíticos no Brasil [22].

Os indivíduos adultos podem ainda apresentar níveis superiores ao normal de HbF sem que isso tenha uma causa genética. É o caso, por exemplo, da resposta do organismo em situações de stresse eritropoiético causado por anemia [23].

A HbF encontra-se distribuída de forma desigual pelos eritrócitos. Os eritrócitos que apresentam uma concentração elevada de HbF têm o nome de células F. Deve realçar-se que as células F não são células fetais, são células adultas típicas com um VGM = 80-90 fL, enquanto que as células fetais são muito maiores, VGM \approx 125 fL. A HbF constitui apenas uma parte da Hb total de uma célula F, sendo a sua concentração variável até 25% da Hb total da célula [23].

Os níveis de HbF assim como o nº de células F são muito variáveis entre indivíduos com Drepanocitose, sendo que o nível de HbF encontra-se entre 0,1% e 30% da Hb total, com uma média de 8% [24]. Num estudo efectuado em afro-americanos com Drepanocitose foi observado que 2 a 80% dos eritrócitos eram células F em comparação com $2,8 \pm 1,6\%$ em afro-americanos normais para esta patologia. Os indivíduos heterozigóticos para a mutação drepanocítica têm uma HbF média de 1,4% e $14,1 \pm 7,5\%$ de células F. Na Drepanocitose, as células F sobrevivem mais tempo do que células não F, e essa sobrevivência depende da quantidade de HbF / células F. Verificou-se também uma elevada correlação entre o número de células F e a percentagem de HbF [25].

Tem sido verificado que na maior parte dos casos, a HbF elevada tem um efeito benéfico nos pacientes drepanocíticos porque as cadeias da γ -globina não polimerizam com a HbS. O efeito anti-polimerizante de HbF reside principalmente em *HBG1* e *HBG2*, mais especificamente nos resíduos de glicina γ^{87} e ácido aspártico γ^{80} . Para além de impedir a polimerização da HbS, a HbF também dilui a concentração desta, atenuando os sintomas da doença. Dado este efeito benéfico da HbF, têm sido usados medicamentos (exemplo a Hidroxiureia) para através do aumento do nível de HbF provocarem melhoria dos sintomas da Drepanocitose [8] e [25]. Num estudo realizado com este tipo de doentes foi verificado que o limiar de HbF para que houvesse prevenção dos sintomas clínicos agudos era de 20%, e para evitar lesões orgânicas era de 10% [26].

1.4.3.1 Factores genéticos moduladores do nível de HbF

1.4.3.1.1 *HBG2*

As regiões a 5' dos promotores dos genes globínicos fetais, Gy-globina (*HBG2*) e Ay-globina (*HBG1*), têm sido alvo de estudo devido ao seu potencial papel regulador da expressão desses genes e da comutação globínica fetal-adulto. Estas regiões são conhecidas por conterem elementos de regulação (tanto positivas,

como negativas) a montante das sequências consenso do promotor [27]. Entre os factores que podem influenciar a produção elevada de HbF no adulto encontram-se uma série de mutações raras e de polimorfismo de um nucleótico (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs) na região promotora e na região regulatória a montante dos genes Gy- e Ay-globina que estão associados, em heterozigotia, a valores de HbF de 2% a 20% [28]. De entre eles salienta-se a associação entre o alelo *Xmn I-HBG2*, nome atribuído ao polimorfismo (C > T) na posição -158 de *HBG2* (rs7482144), e o aumento de HbF bem como a sintomas suaves da doença entre indivíduos com Drepanocitose, contudo este efeito não é notório em indivíduos que não sofram desta patologia. No entanto, pode dar-se o caso de indivíduos homozigóticos para o alelo C terem níveis de HbF altos e indivíduos homozigóticos para o alelo T terem níveis de HbF normais. [16]. Este facto levou a que fosse levantada a hipótese de que o efeito do sítio *XmnI-HBG2* deverá ser modulado por vários outros factores o que condiciona que o seu efeito como modulador do nível de HbF e dos sintomas clínicos não seja consensual. Como este polimorfismo marca os haplótipos Senegal e Asiático, que têm sido considerados mais suaves, é referenciado como associado a nível elevado de Gy-globina e de HbF. Mas, contrariamente, noutros estudos foi observado que o rs7482144 não é uma variante causal para os níveis elevados de HbF em drepanocíticos [29].

Para além da tentativa de associação deste polimorfismo -158 de *HBG2* (rs7482144) com o nível elevado de HbF, outros estudos têm-no relacionado com o número de células F. Foi verificada uma diferença significativa no locus *Xmn I* entre os dois grupos de indivíduos, com níveis altos e baixos de células F. A maioria dos indivíduos do grupo com níveis elevados de células F são homozigóticos ou heterozigóticos para o alelo menos frequente do polimorfismo, enquanto no grupo de indivíduos com níveis baixos de células F está mais patente a homozigotia do alelo mais frequente do polimorfismo [28].

Para além do SNP rs7482144 referido, outros polimorfismos têm sido descritos na região regulatória de *HBG2*. De entre eles salienta-se uma deleção de 6 pb (rs112075505), localizada entre -396 e -391 da região promotora *HBG2* que foi descrita como sendo três vezes mais frequente entre os doentes com Drepanocitose do que em indivíduos normais. Foram também encontrados dois locais polimórficos, a -369 (rs112215533) e -309 (rs112479156) de *HBG2* que estão associados entre si e ao gene β^S -globina ligado ao haplótipo Benim. Foram descritos valores de HbF superiores a 5% nos indivíduos mutantes para os polimorfismos referidos anteriormente [27].

Dado que os resultados de vários estudos estão em contradição efectuou-se esta investigação experimental de modo a averiguar se este *SNP* influencia ou não os níveis de HbF na população drepanocítica em estudo.

1.4.3.1.2 *BCL11A*

O gene *BCL11A* situa-se no cromossoma 2, em 2p16, e codifica a proteína BCL11A (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*) C2H2 do tipo dedos de zinco. O gene correspondente no ratinho é um local comum de integração retroviral em leucemia mielóide e pode funcionar como um gene da doença de leucemia, em parte, através de sua interacção com BCL6. Possivelmente está envolvido na patogénese do linfoma. É indispensável para o normal desenvolvimento da linhagem linfóide. Durante a diferenciação de células hematopoiéticas, este gene é sub-expresso. Nos progenitores eritróides, o factor BCL11A interage fisicamente com o complexo remodelador de cromatina NuRD, e os factores de transcrição eritróides, GATA1 e FOG1. Quando estamos perante níveis de HbF elevados, a expressão de *BCL11A* é reduzida. Foram relatadas cinco variantes resultantes de *splicing* alternativo deste gene [6,21].

Apesar de não ser completamente conhecido como o factor de transcrição BCL11A exerce o seu efeito no *switching* globínico, sabe-se que quando este está presente interage, em conjunto com diversos factores de transcrição referidos anteriormente, com o LCR. Desta interacção resulta a não inibição da expressão dos genes γ - e α -globina no período adulto, enquanto que na ausência de BCL11A é favorecida a expressão destes genes [6,21].

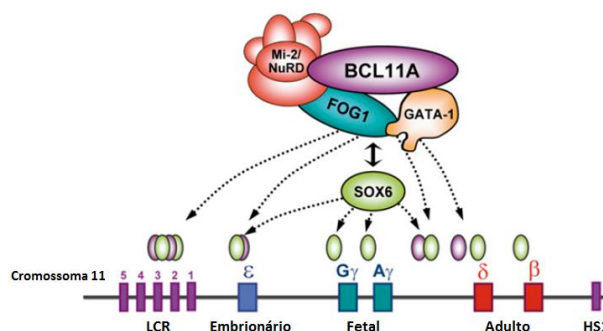


Figura 6 – Representação esquemática da comutação génica globínica durante a vida fetal, modulada pelo factor de transcrição BCL11A. Adaptado de Xu *et al.* 2010 [30].

Em GWAS (*Genome Wide Association Studies*) diferentes, em populações saudáveis, foi verificado que o BCL11A também está relacionado com o tamanho dos eritrócitos (VGM), sugerindo que pode influenciar a cinética de regeneração, da geração e maturação dos eritrócitos [31].

Os *SNPs* localizados no intrão 2 de 14kb de *BCL11A* são os que se correlacionam mais fortemente com a expressão de HbF. O genótipo de *BCL11A* que está associado a elevada expressão de HbF está também associado a uma expressão reduzida de *BCL11A* [16]. O *Quantitative Trait Locus* (QTL) BCL11A mostrou o efeito mais forte sobre os níveis de HbF até a data, parecendo ser crucial no processo de comutação dos genes globínicos e no silenciamento dos genes gama. O *knockdown* de *BCL11A* em células

progenitoras eritróides humanas em cultura levou a uma expressão robusta de HbF, o que está de acordo com o papel de *BCL11A* como repressor de *HBG1* e *HBG2* [29].

De entre os *SNPs* localizados no intrão 2 de *BCL11A*, o rs4671393 parece ser o marcador genético com associação mais forte aos níveis de HbF, numa população de drepanocíticos afro-americanos [29]. Foram no entanto, encontrados outros 2 *SNPs* (rs7599488 e rs10189857) que estão associados independentemente com os níveis de HbF. Estes encontram-se num fraco desequilíbrio de *linkage* (DL) com o rs4671393, mas estão em forte desequilíbrio de *linkage* entre si. De salientar que rs4671393, rs7599488 e rs10189857 são responsáveis por 14,7% da variação fenotípica dos níveis de HbF [29].

Outros autores verificaram que o *SNP* intrónico rs11886868 localizado no intrão 2 do gene *BCL11A* também se correlaciona fortemente com os níveis de HbF e que rs4671393 é o *SNP* mais associado a variações dos níveis de HbF, em indivíduos drepanocíticos afro-americanos [32]. Num estudo realizado numa população de indivíduos drepanocíticos da Tanzânia também se verificou um efeito acentuado dos alelos nos locus rs11886868 e rs4671393 sobre os níveis de expressão de HbF, sendo que esta é notoriamente baixa aquando da presença do alelo menos frequente em rs4671393 (3,7% para G/G e 5,4% para A/G comparativamente com 8,1% para A/A) [33].

Neste trabalho realizou-se um estudo do genótipo da população para os polimorfismos rs11886868, rs10189857 e rs4671393 que em estudos anteriores revelaram ter influência sobre os níveis de HbF de indivíduos drepanocíticos, algo que se pretendia verificar se também ocorre na população em estudo.

1.4.3.1.3 *HBS1L-MYB*

HMIP (*HBS1L-MYB intergenic polymorphism*) refere-se a um segmento de 79Kb, altamente polimórfico, localizado no cromossoma 6 entre o gene *HBS1L* e o oncogene *MYB*. O gene *HBS1L* é o ortólogo nos humanos do gene de *Saccharomyces cerevisiae* e codifica uma proteína com aparente actividade de ligação a GTP, envolvida na regulação de inúmeros processos celulares críticos. O oncogene *MYB* (6q23.3) codifica um factor de transcrição essencial para a diferenciação eritróide na hematopoiese [34,35]. Os *SNPs* em *HMIP* existem em três blocos de desequilíbrio de *linkage*, *HMIP-1*, *HMIP-2*, e *HMIP-3*. O genótipo em cada bloco parece influenciar o número de células F e os níveis de HbF. Assim um estudo realizado numa população de indivíduos saudáveis com ascendência Europeia, revelou que no total, o locus *HMIP* contribui em aproximadamente 17% da variação no número de células F e foi em *HMIP-2* que foi verificado um efeito maior sobre a HbF [34]. Um outro estudo, realizado numa população de indivíduos drepanocíticos afro-americanos, revelou que o *SNP* rs9402686 se encontra fortemente associado aos níveis de HbF [29].

Pensa-se que, apesar de ter sido verificado efeito fisiológico relacionado com alguns *SNPs* situados na referida região intergénica, os responsáveis pelo efeito biológico serão os genes flanqueadores (*HBS1L* e *MYB*). Verificou-se que foi que a expressão de *HBS1L* e *MYB* é significativamente reduzida em culturas de

células eritróides de indivíduos com níveis elevados de HbF, nomeadamente a sobre-expressão de *MYB* em células K562 inibiu expressão da globina, apoiando que o *MYB* tem um papel na regulação de HbF. No entanto não se sabe ao certo qual o mecanismo pelo qual exerce efeito sobre a produção de HbF [36].

Neste trabalho investigou-se o genótipo da população em estudo para o polimorfismo rs9402686 pois já tinha sido anteriormente reportada a sua influência nos níveis de HbF, algo que se pretendia verificar se também ocorre na população em estudo.

II. Objectivos

- ❖ Pesquisar a mutação drepanocítica, (HBB:c.20A>T) no gene *HBB*, de modo a determinar se os indivíduos da população em estudo (diagnosticados clinicamente como doentes drepanocíticos) apresentam um genótipo compatível com os fenótipos hematológico e clínico apresentados.
- ❖ Pesquisar factores genéticos globínicos possíveis moduladores da Drepanocitose:
 - ❖ Pesquisar a deleção de 3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina, na origem de α -talassémia, de modo a determinar a sua possível co-herança e possível relação com a gravidade clínica da doença.
 - ❖ Caracterização do haplótipo de restrição no agrupamento génico da β -globina.
 - ❖ Caracterização dos polimorfismos na região regulatória a montante de *HBG2*, nomeadamente *SNP* rs7482144, rs112479156, rs112215533, e rs112075505.
- ❖ Pesquisar factores genéticos não globínicos possíveis moduladores do nível de hemoglobina fetal e consequentemente da gravidade da Drepanocitose:
 - ❖ Caracterização dos polimorfismos rs11886868, rs10189857 e rs46771393 em *BCL11A*, no cromossoma 2.
 - ❖ Caracterização do polimorfismo rs9402686 em *HMIP*, região intergénica entre *HBS1L* e *MYB* no cromossoma 6.
- ❖ Proceder ao tratamento estatístico dos resultados obtidos.
- ❖ Estabelecer associações entre os genótipos estudados e os fenótipos hematológicos e clínicos.

III. Material e Métodos

1.1 Material de estudo

Os produtos biológicos a analisar são 108 DNAs obtidos de amostras de sangue periférico de indivíduos drepanocíticos seguidos no Hospital de Santa Maria ou no Hospital Fernando da Fonseca, que já são participantes no projecto de investigação intitulado “Desenvolvimento e validação de preditores precoces da vaso-oclusão num modelo mendeliano de doença vascular” – FCT -PIC/IC/83084/2007, em curso neste instituto e liderado pelo Doutor João Lavinha.

Em todos os casos é feita a colheita de amostra de sangue periférico em EDTA após consentimento informado do doente. Cada amostra de sangue é sujeita a extracção automática de DNA num extractor MagnaPure LC, Roche®.

1.2 Pesquisa da mutação drepanocítica

1.2.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de uso corrente nos laboratórios de biologia molecular, que permite a amplificação de uma sequência específica de DNA *in vitro*. Para efectuar esta amplificação é necessário DNA molde, uma mistura reaccional contendo a enzima Taq polimerase e oligonucleótidos iniciadores (*primers*) específicos para o fragmente do DNA que pretendemos amplificar, e um termociclador.

A mutação drepanocítica é detectada pela restrição enzimática de um fragmento DNA amplificado por PCR, de 390 bp, que engloba a região 5' do gene *HBB*. A amplificação específica deste fragmento é realizada através do uso de dois oligonucleótidos específicos chamados 1 e 67 (ver Tabela A.1 do anexo I), segundo as condições descritas na Tabela 1, num aparelho termociclador da marca Biometra.

Tabela 1 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa a mutação drepanocítica

Reagentes	Volume (μL)	Condições de PCR	
H ₂ O bidestilada	40,1		
Tampão PCR	5		
d NTPs	1		
Oligonucleótido iniciador 1 (25pmol/μL)	1	28X	Desnaturação: 94°C 1 min
Oligonucleótido iniciador 67 (25pmol/μL)	1		Annealing: 65°C 1 min
BSA (10mg/mL)	0,7		Extensão: 72°C 1 min
Taq Polimerase (5U/μL)	0,2	Extensão final: 72° 10 min	
DNA molde	1	4°C Pausa	
Total	50		

O sucesso da amplificação do DNA é confirmado através da aplicação de 8μL de produto de PCR num gel de agarose a 1%, obtido a partir de uma mistura de agarose da Seakem com tampão TBE 1 X, onde também se aplicam-se 8μL de Brometo de Etídeo da marca SIGMA a 10mg/mL, isto para um gel de 100mL. Após electroforese, o peso molecular do fragmento obtido é confirmado por comparação com o marcador de peso molecular 1kb da Invitrogen aquando da visualização do gel no transiluminador com a luz UV.

1.2.2 Restrição enzimática do DNA amplificado

A mutação drepanocítica (HBB:c.20A>T) suprime o local de restrição da endonuclease *Bsu* 36I, o que permite distinguir o alelo mutado do normal. A mistura reaccional é preparada pela junção, num tubo tipo eppendorf, de 15μL de produto de PCR com 3,5μL de H₂O e 1,5μL de enzima *Bsu* 36I (10U/μL da New England Biolabs) e incuba-se a 37°C durante 3 a 12h.

É então realizada nova electroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos obtidos. O gel de agarose para visualização dos produtos desta digestão enzimática é de 2% pois uma malha de gel densa permite uma separação mais evidente de fragmentos com dimensões pequenas e semelhantes. Se o indivíduo for homozigótico para a mutação drepanocítica é visível um fragmento de 375 pb, uma vez que a enzima não digeriu esse fragmento; se o indivíduo for normal são visíveis 2 fragmentos de 199 pb e 176 pb correspondentes à digestão do fragmento amplificado pela enzima; se o indivíduo for heterozigótico são visíveis três bandas, com os tamanhos referidos anteriormente.

1.3 Gap-PCR

O Gap-PCR é uma variante de PCR utilizada para determinar os pontos de quebra de deleções conhecidas ou não, utilizando oligonucleótidos iniciadores que se localizam externamente e os mais próximos possível dos pontos de quebra da deleção. Podem ser detectadas deleções no agrupamento génico α-globina, nomeadamente a deleção -α3,7 kb por Gap-PCR usando dois oligonucleótidos iniciadores

complementares das cadeias *sense* e *antisense* das regiões de DNA que flanqueiam externamente a deleção. (ver Tabela A.1 do anexo I).

Para pequenas deleções de menos de 1Kb, o par de oligonucleótidos iniciadores irá dar origem a dois fragmentos, sendo que o mais pequeno provém do alelo com a deleção.

Realiza-se o Gap-PCR segundo as condições descritas na Tabela 2. De notar que são preparadas duas misturas de PCR (α_2 e α_1), que diferem apenas no oligonucleótido iniciador sentido reverso, conforme se pode visualizar na Figura 7.

Tabela 2 - Composição da mistura de PCR usado para detecção da deleção $\alpha_{3,7}$ e as respectivas condições de PCR

Reagentes	Volume (μ L)	Condições de PCR	
H ₂ O bidestilada	30,85	Desnaturação inicial: 94°C 5 min	
Tampão alfa	5		
d NTP's	1		
Oligonucleótido iniciador sentido directo (25pmol/ μ L)	1	34X	Desnaturação: 94°C 1 min
Oligonucleótido iniciador sentido reverso (25pmol/ μ L)	1		Annealing: 64°C 1 min
MgCl ₂	4		Extensão: 72°C 1 min
DMSO	5	Extensão final: 72° 10 min	
BSA (10m/mL)	0,85	4°C Pausa	
Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,3		
DNA molde	1		
Total	50		

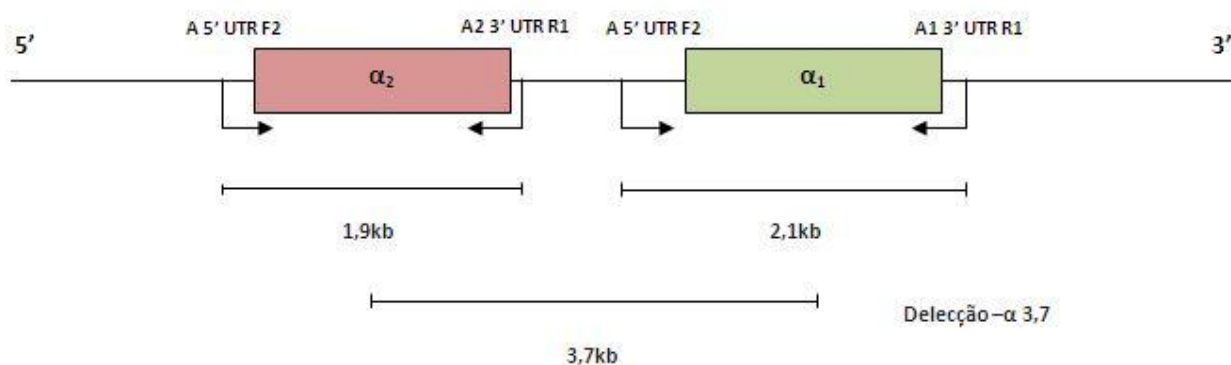


Figura 7 - Representação dos genes α_2 - e α_1 -globina e os respectivos oligonucleótidos iniciadores usados para a sua amplificação. Representação da deleção $\alpha_{3,7}$.

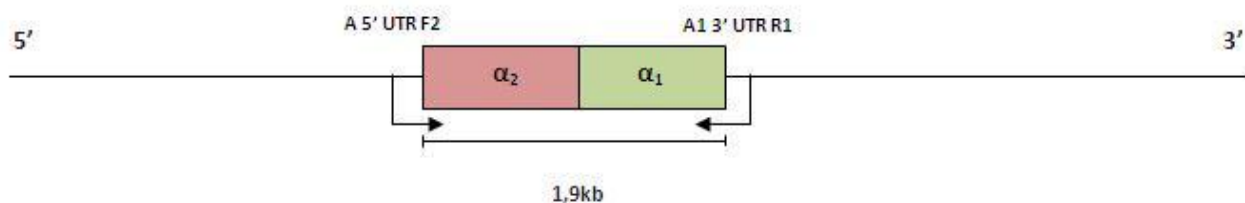


Figura 8 - Representação do gene híbrido $\alpha_2\alpha_1$ resultante da deleção $-\alpha_{3,7}$.

Após submeter os produtos de PCR à electroforese em gel de agarose a 2%, estes são visualizados no transiluminador. Para determinar o genótipo de um indivíduo analisa-se o perfil de bandas nos canais α_2 e α_1 . Se este apresentar uma banda de 1,9 Kb em α_2 e uma banda de 2,1 Kb em α_1 é homozigótico normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); se apresentar uma banda de 1,9Kb em α_2 e em α_1 uma banda de 1,9Kb e uma de 2,1 Kb é heterozigótico ($\alpha\alpha/-\alpha_{3,7}$); se em α_2 não apresentar qualquer banda e em α_1 for visível uma banda de 1,9Kb é homozigótico para a mutação $-\alpha_{3,7}$ ($-\alpha_{3,7}/-\alpha_{3,7}$).

1.4 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Para a determinação do haplótipo caracterizam-se 8 locais polimórficos no agrupamento génico β -globínico. Para cada local é necessário realizar-se um PCR específico, com oligonucleótidos iniciadores específicos, que amplifica a sequência pretendida (ver Tabela A.2 até Tabela A.7 do Anexo I). Posteriormente faz-se a restrição dos fragmentos obtidos com a respectiva endonuclease de restrição, incubando a 37°C durante 3-12h. As enzimas de restrição usadas eram da marca *New England Biolabs* e eram fornecidas na concentração de 10U/ μ L. Em seguida separam-se por peso molecular os fragmentos de DNA obtidos na digestão através de electroforese em gel de agarose a 1%. A análise do número e do tamanho dos fragmentos obtidos permite, após consulta da Tabela A.8 do Anexo I, concluir se estamos em presença ou não do polimorfismo. A análise do conjunto dos polimorfismos ao longo do agrupamento génico permite concluir acerca dos haplótipos (Figura 9).

Para o estudo dos polimorfismos em *HBG2*, *BCL11A* e *HBS1L* as condições dos PCRs específicos para cada polimorfismo estão descritas nas Tabela A.9 a A.12 do Anexo I. As condições de restrição e respectivas enzimas estão descritas na Tabela A.13 do Anexo I.

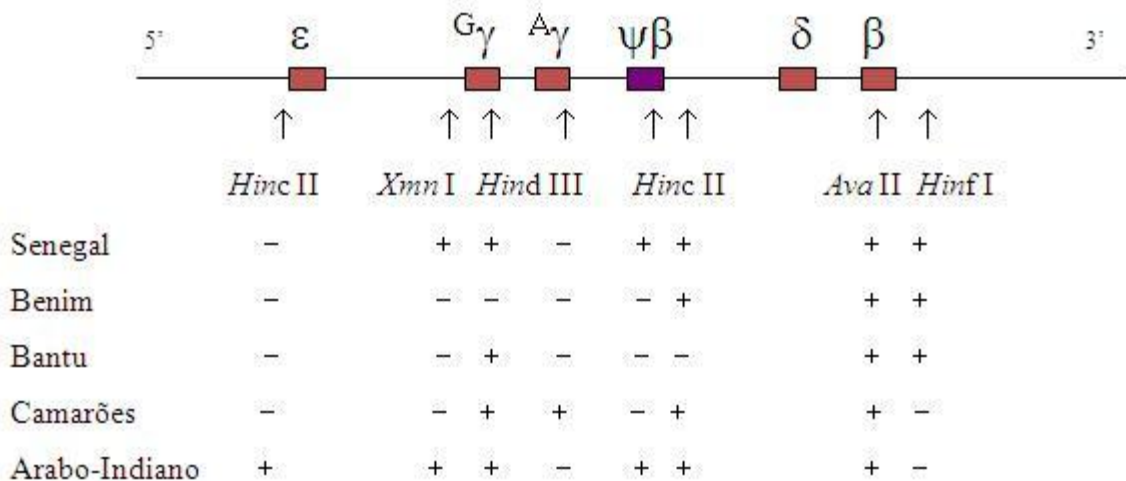


Figura 9 - Representação dos polimorfismos no agrupamento gênico β-globínico e classificação dos haplotipos.

1.5 Purificação dos produtos de PCR para sequenciação

Os produtos de PCR são purificados de modo a maximizar a eficácia do processo de sequenciação. Utiliza-se a solução ExoSAP-IT® da marca USB®. Junta-se 2μL de ExoSAP-IT® a 5μL de produto de PCR e colocam-se os tubos no termociclador a 37°C durante 15 min e depois mais 15 min a 80°C de modo a que se dê a desnaturação do DNA seguida da eliminação dos fragmentos inespecíficos.

1.6 Sequenciação de DNA

Para este fim, usa-se uma técnica baseada no método de Sanger, a qual permite determinar a sequência exacta de uma cadeia de DNA até 500 nucleotídeos. A técnica consiste na síntese de cadeias truncadas a partir do fragmento de molde, cadeias essas que são marcadas com fluorescência numa extremidade e diferem entre si por um nucleótido. Assim, inicialmente procede-se à desnaturação do fragmento de DNA de dupla cadeia, originando cadeias molde para a síntese *in vitro* de DNA. É necessário um oligonucleótido iniciador que define qual a cadeia usada como molde. A síntese das cadeias é conseguida pelo uso de ddNTPs (didesoxirribonucleótidos trifosfatados), os quais, ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH. Em cada reacção, um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização. No presente estudo realizou-se a sequenciação do DNA pretendido, previamente purificado com a solução ExoSAP-IT®, usando um kit comercial BigDye Terminator V 1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems), seguindo as indicações do fabricante. Por separação das cadeias truncadas através de um

sequenciador automático 3130X Genetic Analyser, Abi Prism (Applied Biosystems), pode estabelecer-se a sequência de nucleótidos do fragmento de DNA original.

No caso do polimorfismo rs10189857 visto não haver nenhuma enzima com sequência de reconhecimento e de clivagem neste local recorreu-se à sequenciação do DNA amplificado, cuja mistura e condições de PCR estão descritas na Tabela A.14 dos anexos.

A sequenciação automática foi também usada na caracterização dos polimorfismos rs7482144, rs112479156, rs112215533, e rs112075505; pois evitou-se gastos em reagentes necessários para a amplificação das amostras para, posteriormente, digerir com enzimas diferentes.

1.7 Tratamento estatístico dos dados

Após análise de todos os dados obtidos decorrentes do trabalho laboratorial, para poder relacioná-los com os dados clínicos que foram fornecidos pelos clínicos, foi necessário um tratamento estatístico do conjunto dos dados, realizado no programa SPSS 17.0. A avaliação da normalidade da distribuição foi efectuada através do teste de Shapiro-Wilk. As associações dos genótipos com o nível de HbF foram pesquisadas pelos testes paramétricos ANOVA e Bonferroni e pelos testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Witney. As comparações múltiplas foram efectuadas pelo teste de Bonferroni (ou post-hoc).

Para o cálculo da frequência alélica usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência alélica} = \frac{2 \times \text{homozigóticos} + \text{heterozigóticos}}{2 \times \text{total de indivíduos}} \times 100$$

De modo a averiguar se existia alguma associação entre os vários parâmetros e a gravidade clínica da Drepanocitose, relacionou-se o número de crises de dor aguda com internamento com o tempo de seguimento clínico dos indivíduos e, por sua vez, com o genótipo. Para isto calculou-se a taxa de incidência de crises por 100 pessoas-mês por genótipo (AA e aa representam os diferentes homozigóticos de um genótipo genérico).

$$\text{Taxa de Incidência (AA)} = \frac{n^{\circ} \text{ total de crises (AA)} *}{n^{\circ} \text{ total de meses de seguimento (AA)}} \times 100$$

Na fórmula, o “*nº total de crises (AA)*” corresponde ao número total de crises que levaram a internamento de todos os doentes com o genótipo AA em todo o tempo (expresso em meses) em que foram acompanhados no hospital e cujo registo foi usado neste projecto.

Por outro lado, o “*nº total de meses de seguimento (AA)*”, corresponde ao número total de meses que esses mesmos doentes com o genótipo AA foram seguidos e cujo registo foi usado neste projecto.

A aplicação da fórmula permite obter a taxa de incidência expressa em nº de crises por pessoa. mês.

Posteriormente, de modo a verificar se havia algum genótipo em que o curso clínico da doença fosse mais suave (menor número de crises com internamento), calculou-se a razão das taxas de incidência, comparando o genótipo em homozigotia, que se pensa ter um curso clínico mais grave, com o heterozigótico e com o outro homozigótico que, supostamente, é mais suave.

$$\text{razão das Taxas de incidência} = \frac{\text{Taxa de incidência (AA)}}{\text{Taxa de incidência (aa)}}$$

Por fim, para obter uma percentagem do quão mais suave um genótipo é em relação a outro usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem da razão das Taxas de incidência} = (1 - \text{razão da Taxa de incidência}) \times 100$$

IV. Resultados e Discussão

1.1 Caracterização da população em estudo

A população de que se dispunha para estudar era constituída por 108 indivíduos, na sua maioria de raça negra, seguidos no Hospital de Santa Maria e no Hospital Fernando da Fonseca. A maioria destes indivíduos ou são portugueses descendentes de angolanos ou angolanos que imigraram para Portugal. Realizaram-se todos os procedimentos experimentais descritos no capítulo de Materiais e Métodos para as 108 amostras. No entanto, são apresentados os resultados de 70 indivíduos. Tal deveu-se à exclusão de indivíduos que não eram homozigóticos para a mutação drepanocítica, ou que estavam a ser tratados com hidroxiureia, ou com idade inferior a 3 anos (para não falsear os valores de HbF) ou devido a outras dificuldades na aquisição dos dados clínicos necessários para comparar e relacionar com os resultados obtidos experimentalmente.

Destes 70 indivíduos, 33 eram do sexo feminino e 37 do sexo masculino, com uma idade média de 10,9 anos e mediana de 11 anos, com 4,5 anos de desvio padrão e um nível médio de HbF de 10%. Estabeleceram-se dois grupos dentro da população, um que incluía indivíduos com HbF < 8% e outro com HbF ≥ 8%. Utilizou-se como *cut-off* o valor 8% pois este representa o valor percentual médio de HbF na Drepanocitose [24].

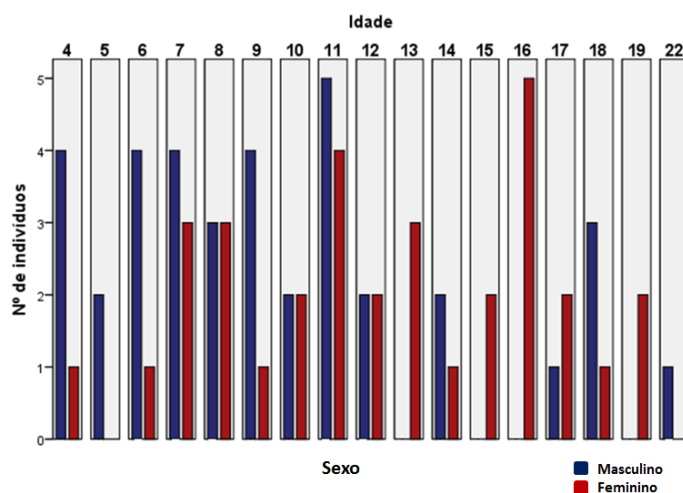


Figura 10 – Gráfico onde está representada a distribuição da população por idade e por sexo.

1.2 Pesquisa da mutação drepanocítica

A análise sobre a presença da mutação drepanocítica foi efectuada por PCR-RFLP tal como descrito no capítulo de Materiais e Métodos. Foram analisadas 108 amostras de DNA. Concluiu-se quanto à presença ou não da mutação drepanocítica através da interpretação do perfil electroforético dos géis de agarose tal como abaixo mencionado (Figura 11).

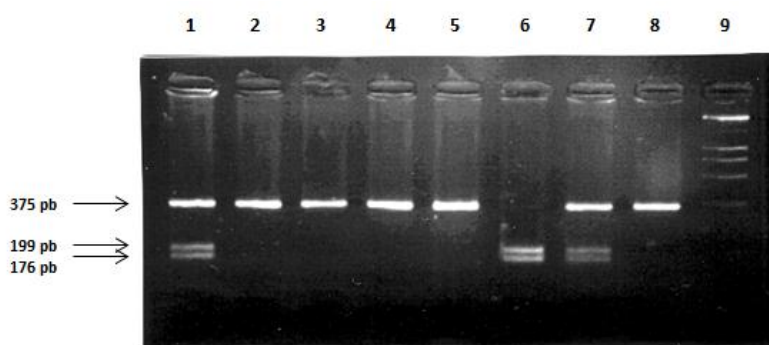


Figura 11 - Gel de electroforese exemplificativo de uma digestão com a enzima *Bsu* 36I de um fragmento amplificado da região 5' do gene da beta-globina. É possível visualizar o perfil electroforético de indivíduos homozigóticos para a mutação drepanocítica nos canais 2 a 5 e 8; heterozigótico nos canais 1 e 7; homozigótico normal no canal 6. O canal 9 corresponde ao marcador de peso molecular Hyper Ladder. De notar que as amostras 6, 7 e 8 são controlos, respectivamente, normal, heterozigótico e mutado.

Após completar a análise de todas as amostras, verifiquei que em dois casos os indivíduos eram heterozigóticos para a mutação drepanocítica e um outro não tinha a mutação em nenhum dos alelos. Assim, estas três amostras foram excluídas do estudo pois este visa apenas indivíduos homozigóticos para esta mutação. Idealmente as 108 amostras corresponderiam na sua totalidade a indivíduos homozigóticos para a mutação drepanocítica. No entanto, foram selecionados dois casos que revelaram ser talassodrepanocíticos (compostos heterozigóticos para HbS e para HbD) – a progressão do estudo e diagnóstico da HbD nestes indivíduos foi efectuada por outro colega do laboratório. A HbD apresenta uma migração electroforética semelhante à HbS pelo que sendo usada apenas uma metodologia de diagnóstico (por exemplo a electroforética de hemoglobinas) não é detectável. Estes indivíduos apresentam um quadro clínico semelhante aos homozigóticos para a Drepanocitose. Assim, estes dois casos estavam erradamente diagnosticados no hospital. Quanto ao indivíduo normal aqui detectado tratou-se de erro humano na selecção e colheita da amostra.

1.3 Pesquisa da deleção $-\alpha 3,7$ e relação com os níveis de HbF

Após realizar o procedimento experimental (Gap-PCR) para identificação da deleção de 3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina, confirmou-se o perfil electroforético de cada indivíduo em gel de agarose (Figura 12). Calculou-se a frequência alélica segundo a fórmula descrita no capítulo Material e Métodos. Observou-se uma frequência alélica de 71% para o alelo normal ($\alpha\alpha$) e de 29% para o alelo com a deleção de

3,7 kb ($-\alpha 3,7$), o que está de acordo com o obtido numa população geral de indivíduos afro-americanos, em que se obtiveram frequências alélicas de 69,2% para o alelo normal ($\alpha\alpha$) e de 30,8% para o alelo com a deleção de 3,7 kb [37].

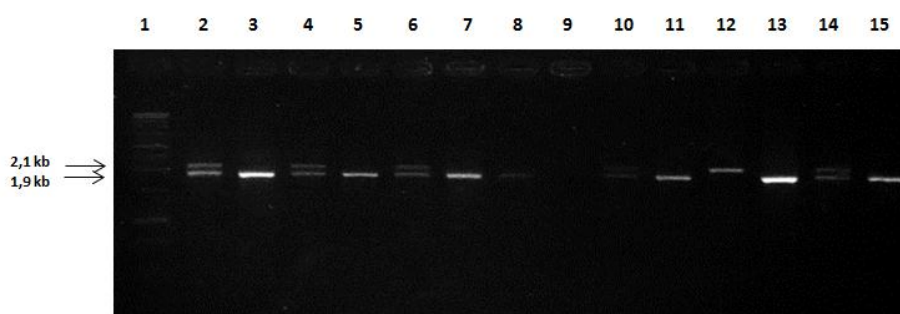


Figura 12 - Gel de electroforese representativo de um Gap-PCR usado para detectar a deleção de 3,7 kb. No canal 1 encontra-se o marcador de peso molecular Hyper Ladder, nos canais 2 e 3, 4 e 5, 6 e 7, 10 e 11, 14 e 15 correspondem ao perfil electroforético de indivíduos heterozigóticos para a deleção; nos canais 8 e 9 de um homozigótico para a deleção e nos canais 12 e 13 um homozigótico normal.

Após a determinação da frequência de α -talassémia nesta população, pretendeu-se verificar se a co-herança deste factor genético com a drepanocitose era um factor que modulava o nível de HbF nos doentes. Assim, primeiramente, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para saber se esta população segue, ou não, uma distribuição normal (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* p
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	10,2	7,0	7,9	2,3	28,7	0,000
$\alpha\alpha/-\alpha 3,7$	23	11,3	7,3	10,0	1,8	27,2	0,055
$-\alpha 3,7/-\alpha 3,7$	9	8,5	6,2	9,0	1,9	22	0,169
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$;

N = nº de indivíduos

Observaram-se, aparentemente, valores médios de HbF muito semelhantes entre os 3 genótipos da α -globina ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$; $\alpha\alpha/-\alpha 3,7$; $-\alpha 3,7/-\alpha 3,7$). Dado que o resultado obtido com o teste de Shapiro-Wilk revelou tratar-se de uma população que não segue uma distribuição normal ($p < 0,05$), aplicaram-se seguidamente os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para averiguar se havia associação entre os referidos genótipo e o nível de HbF (Tabela 4).

Tabela 4 – Associação entre a percentagem de HbF e os genótipos da Alfa-talassémia

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	7,0	7,9	0,592 ¹
$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	23	7,3	10,0	
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	9	6,2	9,0	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Verificou-se que não há relação, com significância estatística, entre a presença, quer em heterozigotia quer em homozigotia, desta deleção e o nível de HbF ($p = 0,592$). Estes resultados vêm de encontro ao esperado pois na literatura está descrito, apesar de não ser consensual, que a Alfa-talassémia pode afectar o curso clínico da Drepanocitose de diversas formas mas não através do aumento do nível de HbF [18,19].

1.3.1 Caracterização dos níveis de HGM, VGM e Hb Total

Outros factores que se sabe que são alterados na presença de α -talassémia são o HGM e o VGM, que correspondem à concentração de hemoglobina no interior do eritrócito e ao tamanho deste, respectivamente, e a Hb total. Foi efectuada a análise pelo teste de Shapiro-Wilk à população para averiguar da sua normalidade em relação aos parâmetros HGM, VGM e Hb total (Tabela 5).

Tabela 5 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HGM, VGM e Hb total associados a cada genótipo e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

	Genótipo	N	média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk p*
HGM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38,0	28,2	2,6	28,3	22,0	33,7	0,919
	$\alpha\alpha/-3,7$	23,0	25,0	1,9	25,6	21,8	28,8	0,306
	$-3,7/-3,7$	9,0	21,7	2,6	21,7	18,7	26,0	0,212
VGM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	83,2	5,9	82,9	67,0	95,5	0,382
	$\alpha\alpha/-3,7$	23	74,1	5,4	74,9	64,0	83,2	0,542
	$-3,7/-3,7$	9	66,1	9,1	64,3	54,0	82,5	0,727
Hb total	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	7,8	0,9	7,6	6,6	9,9	0,003
	$\alpha\alpha/-3,7$	23	8,2	0,7	8,1	7,3	9,9	0,078
	$-3,7/-3,7$	9	8,4	0,7	8,4	7,6	9,8	0,419

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Após a análise verificou-se que a distribuição era normal ($p \geq 0,05$) para os parâmetros VGM e HGM e, seguidamente, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA para verificar se havia associação entre o genótipo da deleção $-\alpha3,7$ e o nível de HGM e VGM (Tabela 6 A, Tabela 7 A). Fizeram-se comparações múltiplas,

também para os diferentes parâmetros, entre os diferentes genótipos para perceber entre quais as diferenças são maiores usando o teste paramétrico Bonferroni (Tabela 6 B, Tabela 7 B).

Foram também feitos testes para verificar se havia associação entre o genótipo e o valor de Hb total usando o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que, neste caso, se verificou que a população não seguia uma distribuição normal para este parâmetro (Tabela 8 A). Fizeram-se comparações múltiplas entre os diferentes genótipos para perceber entre quais as diferenças são maiores recorrendo ao teste de Mann-Whitney (Tabela 8 B).

Tabela 6 – A: Associação entre o valor de HGM e os genótipos da Alfa-talassémia. **B:** Comparações múltiplas entre os genótipos de alfa-talassémia e os valores de HGM

A

Genótipo	N	HGM (pg)		
		média	desvio padrão	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	28,2	2,6	0,000 ¹
$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	23	25,0	1,9	
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	9	21,7	2,6	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 ANOVA

2 Teste de Bonferroni

N=nº de indivíduos

B

Genótipos em comparação		HGM (pg)	
		Diferença das médias	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	3,2	0,000 ²
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	6,5	0,000 ²
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	-3,2	0,003 ²

Tabela 7 - A: Associação entre o valor de VGM e os genótipos da Alfa-talassémia. **B:** Comparações múltiplas entre os genótipos de Alfa-talassémia e os valores de VGM

A

Genótipo	N	VGM (fL)		
		média	desvio padrão	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	83,2	5,9	0,000 ¹
$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	23	74,1	5,4	
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	9	66,1	9,1	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 ANOVA

2 Teste de Bonferroni

N=nº de indivíduos

B

Genótipos em comparação		VGM (fL)	
		Diferença das médias	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	9,2	0,000 ²
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	17,1	0,000 ²
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	-8,0	0,005 ²

Tabela 8 - A: Associação entre o valor de Hb Total e os genótipos da Alfa-talassémia. **B:** Comparações múltiplas entre os genótipos de Alfa-talassémia e os valores de Hb Total

A

Genótipo	N	Hb Total g/dL)		
		desvio padrão	mediana	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	38	0,9	7,6	0,033 ¹
$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	23	0,7	8,1	
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	9	0,7	8,4	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

2 Teste de Mann-Whitney

N=nº de indivíduos

B

Genótipos em comparação		Hb Total (g/dL)	
		Diferença das médias	p*
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	-0,3	0,046 ²
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	-0,6	0,038 ²
$-\alpha3,7/-\alpha3,7$	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$	0,2	0,303 ²

Verificou-se que indivíduos drepanocíticos que co-herdaram α -talassémia têm, simultaneamente, um perfil hematológico característico de ambas as patologias: HbF aumentada (8,5%) em relação ao nível basal de um indivíduo normal (1%), o valor de VGM obtido foi de $66,1 \text{ fL} \pm 9,1$ o que corresponde a microcitose (VGM < 80 fL), o valor de HGM obtido foi de $21,7 \text{ pg} \pm 2,6$ o que corresponde a hipocromia (HGM < 27 pg) e o valor obtido para a Hb total foi de $8,4 \text{ g/dL} \pm 0,7$ o que corresponde a uma anemia (Hb total < 13 g/dL nos homens e < 11,5 g/dL nas mulheres). Apesar do valor normal de Hb total no homem e na mulher ser diferente, os valores obtidos são inferiores aos normais de ambos [17]. Seria expectável que indivíduos homozigóticos para a deleção $-\alpha3,7$ tivessem uma anemia mais marcada que os indivíduos onde esta deleção está ausente, no entanto verificou-se o oposto. Este facto será, provavelmente, devido ao baixo número de indivíduos homozigóticos ($n = 9$). Contudo, no caso do VGM e do HGM a microcitose e hipocromia são proporcionais ao número de genes α perdidos, ou seja, os heterozigóticos têm valores um pouco mais elevados que os apresentados acima. Todos estes factos foram comprovados pois foi encontrada significância estatística aquando da associação do genótipo da deleção de 3,7 kb e cada um destes 3 parâmetros e também nas comparações múltiplas entre os genótipos e cada parâmetro, como se pode ver nas tabelas apresentadas acima.

1.3.2 Relação entre a co-herança da Alfa-talassémia e o curso clínico da Drepanocitose

Como parâmetro clínico para avaliar a gravidade da doença em cada indivíduo, usou-se o “número de crises com internamento”, uma vez que sintomas exacerbados de vaso-oclusão e hemólise levam, geralmente, ao recurso ao hospital e consequente internamento do indivíduo, facto que é registado e documentado. O uso deste parâmetro possibilitou comparações da gravidade do curso clínico entre os genótipos.

Assim, foi-nos permitido averiguar qual o genótipo associado ao curso clínico mais suave, ou seja, com menos manifestações de crises vaso-oclusivas graves. Para tal, recorreu-se ao cálculo da percentagem da razão das taxas de incidência, calculadas como descrito no capítulo de Materiais e Métodos. Apresenta-

se, seguidamente, os cálculos exemplificativos efectuados para determinar o efeito de um genótipo (neste caso da α -talassémia).

Começou por calcular-se a Taxa de incidência do genótipo normal ($\alpha\alpha$):

$$\text{Taxa de Incidência } (\alpha\alpha/\alpha\alpha) = \frac{n^{\circ} \text{ total de crises } (\alpha\alpha)}{n^{\circ} \text{ total de meses de seguimento}} = \frac{295}{2634} \times 100 = 11,2 \text{ crises por pessoa.mês}$$

Posteriormente calculou-se a razão das taxas de incidência:

$$\text{razão das Taxas de incidência} = \frac{\text{Taxa de Incidência } (\alpha\alpha/\alpha\alpha)}{\text{Taxa de Incidência } (-\alpha 3,7/-\alpha 3,7)} = \frac{11,2}{12,7} = 0,880$$

Por último calculou-se a percentagem da razão das taxas de incidência:

$$\text{Percentagem da razão das Taxas de incidência} = (1 - \text{razão da Taxa de incidência}) \times 100 = 1 - 0,880 \times 100 = 12\%$$

Depois de efectuados os cálculos para os três genótipos, verificou-se que indivíduos com genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ têm um curso clínico 12% mais suave que os $-\alpha 3,7/-\alpha 3,7$ e os $\alpha\alpha/-\alpha 3,7$ têm um curso clínico 29% mais suave que os $-\alpha 3,7/-\alpha 3,7$.

Neste estudo verificou-se que dos três genótipos da α -globina, os indivíduos homozigóticos para a deleção de 3,7 kb eram os que tinham um curso clínico com maior gravidade, muito provavelmente porque a presença desta deleção em homozigotia (ou seja resultando a perda de cerca de 50% das cadeias α -globina) traduz-se por uma adição (simples ou sinérgica) dos efeitos nefastos de ambas as patologias, tanto da α -talassémia (aumentando por exemplo a da viscosidade do sangue tal como já foi descrito [9,19] como da drepanocitose. Daqui poder-se-ia concluir que a presença de α -talassémia na sua forma mais grave é, em geral, um factor agravante do curso clínico da drepanocitose, aumentando o número de internamentos por ano. Para ser mais correcto e preciso na conclusão poderiam ter sido discriminadas as causas que levaram ao internamento dos indivíduos. Isto permitiria concluir sobre quais as manifestações clínicas específicas que são agravadas pela herança concomitante da α -talassémia em homozigotia com a Drepanocitose. Contudo, devido à dificuldade de aquisição de dados clínicos essa hipótese foi abandonada.

No entanto, e muito curiosamente, foi verificado que os heterozigóticos para a deleção (perda de cerca de 25% das cadeias α -globina) eram os que tinham menos crises de dor aguda com internamento. Tal pode dever-se ao facto da co-herança de Alfa-talassémia (na sua forma suave de perda de um só gene) com Drepanocitose estar associada a uma diminuição da percentagem de HbS (tal como descrito por outros autores) que leva a uma menor taxa de hemólise e menos lesões nos tecidos [10]. Nesta situação, a pequena diminuição do número de cadeias α -globina não é suficiente para se manifestar o efeito nefasto da sua falta, sendo até o efeito conjunto com a drepanocitose benéfico. Podemos, pois, concluir que o efeito benéfico ou

prejudicial da α -talassémia co-herdada com a drepanocitose é dependente do “efeito de dosagem” das cadeias α -globina.

Para reforçar esta conclusão sobre o efeito da Alfa-talassémia no curso clínico da Drepanocitose, era vantajoso dispor-se de uma população de maior dimensão para análise, assim como aprofundar o estudo, analisando quais os tipos de manifestações clínicas que eram moduladas.

1.4 Caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina

Para a caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina são, habitualmente, analisados oito polimorfismos no agrupamento génico da β -globina (Figura 9). No entanto, neste estudo não foram caracterizados os locais polimórficos *Hinc* II ϵ e *Ava* II pois, sendo a população em estudo constituída por africanos e descendentes de africanos, estes locais polimórficos não influenciariam na classificação do haplótipo.

A totalidade da população foi caracterizada pela metodologia de PCR-RFLP ou por sequenciação, segundo o protocolo específico apresentado no capítulo de Materiais e Métodos, para cada um de seis locais polimórficos. Seguidamente apresenta-se um exemplo da obtenção da caracterização para cada polimorfismo (Figura 13 a 18).

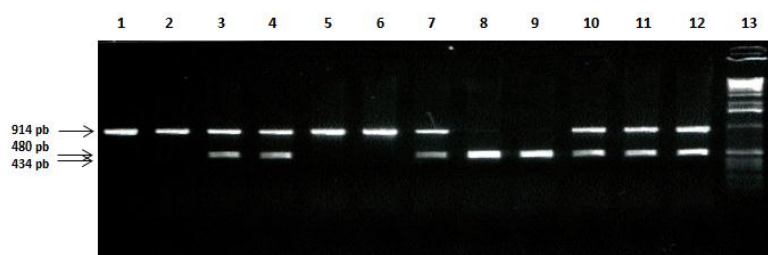


Figura 13 – Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado da extremidade 3' do $\psi\beta$, digerido com *Hinc* II. No canal 13 encontra-se o marcador de peso molecular de 1 kb. Nos canais 1, 2, 5 e 6 a enzima não digeriu o fragmento; nos canais 3, 4, 7, 10 e 11 a enzima digeriu apenas num dos alelos; nos canais 8 e 9 a enzima digeriu em ambos os alelos. O canal 12 corresponde ao controlo heterozigótico.

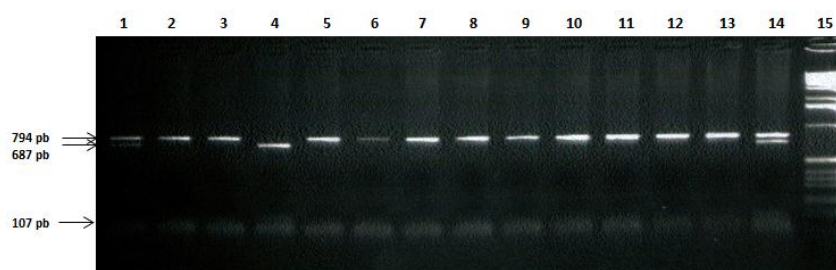


Figura 14 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado da extremidade 5' do $\psi\beta$, digerido com *Hinc* II. No canal 15 encontra-se o marcador de peso molecular de 1 kb. Nos canais 2, 3 e 5 a enzima não digeriu o fragmento; no canal 1 a enzima digere apenas num dos alelos; no canal 4 a enzima digere em ambos os alelos. O canal 14 corresponde ao controlo heterozigótico.

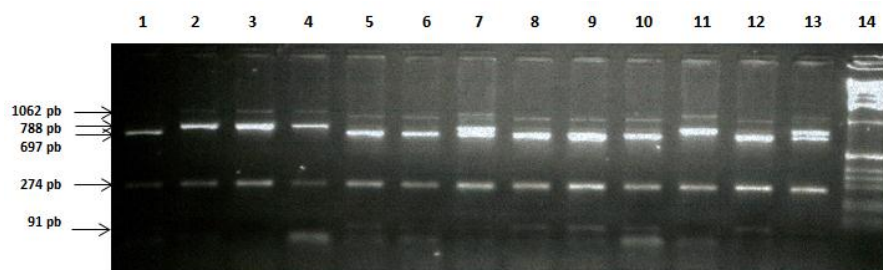


Figura 15 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado da extremidade 5' do gene Gy-globina, digerido com *Hind* III. No canal 14 encontra-se o marcador de peso molecular de 1 kb. Nos canais 2, 3, 4 e 11 a enzima não digeriu na região do polimorfismo; no canal 7 a enzima digeriu na região do polimorfismo em apenas num dos alelos; nos canais 1, 5, 6, 8, 9, 10 e 12 a enzima digeriu na região do polimorfismo em ambos os alelos. O canal 13 corresponde ao controlo heterozigótico.

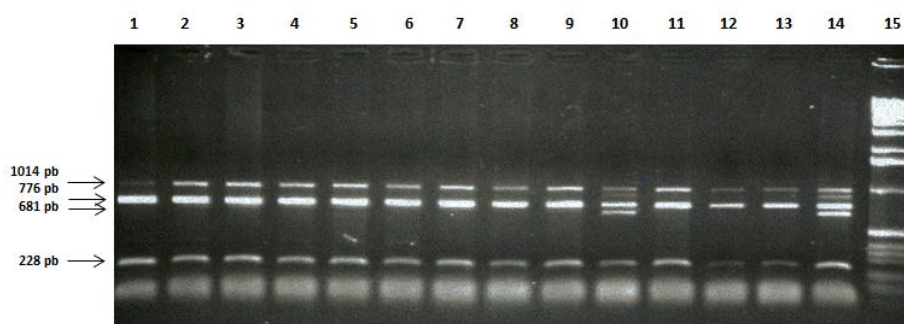


Figura 16 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado da extremidade 5' do gene Ay, digerido com *Hind* III. No canal 15 encontra-se o marcador de peso molecular de 1 kb. Nos canais 1 a 9 e 11 a 13 a enzima não digeriu em nenhum dos alelos na região do polimorfismo, as bandas obtidas são devido a digestão pela enzima em locais não polimórficos; no canal 10 a enzima digeriu apenas num dos alelos. O canal 14 corresponde ao controlo heterozigótico.

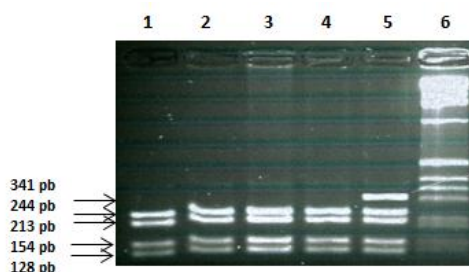


Figura 17 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado a jusante do gene β -globina, digerido com *Hinf* I. No canal 6 encontra-se o marcador de peso molecular de 1 kb. Nos canais 1 a 4 a enzima digeriu em ambos os alelos; no canal 5 a enzima digeriu apenas num dos alelos, e corresponde ao controlo heterozigótico.

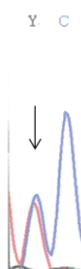


Figura 18 - Sequenciação parcial do gene Gy-globina com local polimórfico T/C correspondente ao local de restrição da enzima *Xmn* I (rs7482144).

Após analisados os seis polimorfismos no agrupamento génico da β -globina, comparou-se os perfis de clivagem de cada enzima para cada um dos locais polimórficos de cada indivíduo com a Figura 9 e, assim, classificaram-se os indivíduos quanto ao haplótipo no agrupamento génico da β -globina. Quando o perfil de clivagem das enzimas para um dado indivíduo não coincidiu com nenhum dos haplótipos descritos na Figura 9, definiu-se que este tem um haplótipo atípico.

Calculou-se a frequência de cada haplótipo segundo a fórmula descrita para a frequência alélica no capítulo Material e Métodos. Observou-se que o haplótipo mais frequente, nesta população, era o Bantu com 63,6%, seguido dos haplótipos Benim e Senegal com 18,6% e 15,7% respectivamente, o haplótipo atípico verificou-se ser muito pouco frequente, com apenas 2,1%.

Seguidamente pretendeu-se verificar se o haplotipo de um indivíduo drepanocítico é capaz de condicionar o seu nível de HbF. Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal (Tabela 9).

Tabela 9 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada haplótipo no agrupamento génico da β -globina e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Haplótipo	N	% HbF					
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* <i>p</i>
Bantu/Bantu	37	8,2	4,9	7,4	1,8	22,0	0,018
Bantu/Benim	7	13,7	8,4	12,1	3,4	27,2	0,682
Bantu/Senegal	5	11,2	8,4	7,8	5,0	26,0	0,028
Bantu/Atípico	3	11,2	7,6	10,8	3,8	19,1	0,906
Benim/Benim	8	12,1	10,0	9,3	3,0	28,7	0,018
Benim/Senegal	3	10,6	7,3	14,0	2,3	15,6	0,211
Senegal/Senegal	7	15,0	8,2	15,0	4,0	27,1	0,946
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Como se verificou que a distribuição não era normal aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação entre o valor de HbF e os haplótipos no agrupamento génico da β -globina

		% HbF		
Haplótipo	N	desvio padrão	mediana	p^*
Bantu/Bantu	37	4,9	7,4	0,337 ¹
Bantu/Benim	7	8,4	12,1	
Bantu/Senegal	5	8,4	7,8	
Bantu/Atípico	3	7,6	10,8	
Benim/Benim	8	10,0	9,3	
Benim/Senegal	3	7,3	14,0	
Senegal/Senegal	7	8,2	15,0	
Total	70	7,0	9,1	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Dado que não se encontrou significância estatística na associação do haplótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,337$), não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney.

Verificou-se que, como descrito na literatura [8] e [9], dentro desta população o haplótipo aparentemente associado a níveis mais elevados de HbF é o Senegal quando em homozigotia (média de HbF = $15 \pm 8,2\%$), provavelmente devido à presença do polimorfismo rs7482144 e outros que se encontram em *linkage* com este. Observou-se também que o haplotipo Bantu, quando em homozigotia, está associado tendencialmente a níveis de HbF mais baixos (média de HbF = $8,2 \pm 4,9\%$). Por outro lado o haplotipo Benim em homozigotia aparenta conferir um efeito intermédio aos anteriores (média de HbF = $12,1 \pm 10,0\%$). Contudo é bastante evidente um grande desvio padrão em todas as classes, mostrando uma grande variabilidade interindivíduo quanto ao nível de HbF.

O haplótipo Benim/Senegal era de esperar que fosse o 2º com níveis de HbF mais altos mas observa-se que é o que apresenta a 2ª mediana mais baixa; no entanto, o pressuposto inicial é corroborado pela média que é bastante alta, sendo este um bom exemplo das diferenças entre a média e a mediana que acabou de ser referido. O haplótipo Benim/Senegal também seria expectável que tivesse valores um pouco mais elevados pelo facto de num dos alelos ser Senegal; no entanto, verificou-se um dos valores mais baixos. Estas diferenças em relação ao descrito na literatura muito provavelmente serão devidas à amostra ter um tamanho muito reduzido, fazendo com que os *outliers* distorçam as médias.

Conclui-se, então, que apesar de se ter encontrado a tendência esperada entre o haplotipo e o nível de HbF, essa tendência não foi confirmada estatisticamente pelo que não podemos concluir que haja uma verdadeira associação entre estes dois factores na nossa população. Uma razão para isso poderá ser o relativamente pequeno número de indivíduos analisados.

É curioso não ter sido encontrada significância estatística entre a presença do polimorfismo *Xmn I-HBG2* (rs7482144) e um nível elevado de HbF, pois em alguns estudos já foi verificada uma forte associação [16] e [28]. O nosso resultado poderá dever-se ao tamanho da amostra ser reduzido, por estarem a actuar outros factores moduladores do nível de HbF conjuntamente com este e com efeito oposto, ou mesmo que o polimorfismo *Xmn I-HBG2* (rs7482144) não esteja associado ao nível de HbF elevado. Podemos encontrar na literatura, pelo menos, mais um estudo cujos resultados corroboram os meus [29]. Conclui-se, portanto, não haver uma corência a nível da comunidade científica sobre a associação, ou não deste polimorfismo, e consequentemente do haplótipo, com o nível elevado de HbF.

1.4.1 Caracterização dos polimorfismos da região do promotor do gene Gy -globina

Os polimorfismos rs112215533, rs112075505 e rs112479156 localizados na região promotora do gene Gy -globina não fazem parte do haplótipo no agrupamento génico da β -globina; no entanto como estão situados no mesmo fragmento que foi amplificado e sequenciado para caracterizar o polimorfismo *Xmn I-HBG2* (rs7482144), apresentam-se aqui também os resultados obtidos (Figura 19 A, B e C).

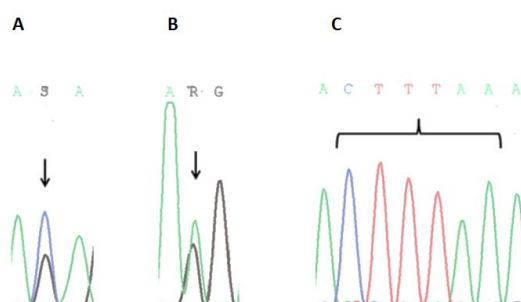


Figura 19 - **A:** Sequenciação parcial do promotor do gene Gy -globina com local polimórfico G/C correspondente ao polimorfismo rs112215533. **B:** Sequenciação parcial do promotor do gene Gy -globina com local polimórfico G/A correspondente ao polimorfismo rs112479156. **C:** Sequenciação parcial do promotor do gene Gy -globina com deleção de 6 nucleótidos correspondente ao polimorfismo rs112075505 (neste caso em homozigotia).

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs112215533 (Tabela 11).

Tabela 11 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs112215533 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					Shapiro-Wilk* <i>p</i>
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	
CC	54	9,7	6,5	7,8	1,8	27,2	0,000
CG	8	11,0	6,7	11,5	2,3	22,5	0,862
GG	7	13,0	10,5	9,4	3,0	28,7	0,043
Total	69	10,2	6,9	9,0	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Como se verificou que a distribuição não era normal aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 12).

Tabela 12 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112215533

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p^*
CC	54	6,5	7,8	0,736
CG	8	6,7	11,5	
GG	7	10,5	9,4	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Dado que não se encontrou significância estatística na associação do genótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,736$), não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney.

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs112075505 (Tabela 13).

Tabela 13 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs112075505 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* p
AA	51	9,3	6,1	7,5	1,8	27,1	0,000
AG	11	12,6	7,5	12,1	2,3	27,2	0,678
GG	7	13,0	10,5	9,4	3,0	28,7	0,043
Total	69	10,2	6,9	9,0	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Verificou-se que a amostra não segue uma distribuição normal, pelo que foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, de modo a determinar se existia associação entre este polimorfismo e o nível de HbF (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112075505

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p*
AA	51	6,1	7,5	0,276 ¹
AG	11	7,5	12,1	
GG	7	10,5	9,4	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Dado que não se encontrou significância estatística na associação do genótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,276$), não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney.

Após estes testes verificou-se que não existe uma relação com significância estatística, nem entre o genótipo do polimorfismo rs112215533 e o nível de HbF ($p = 0,736$), nem entre o genótipo do polimorfismo rs112075505 e o nível de HbF ($p = 0,276$). No entanto, é visível uma tendência de níveis superiores de HbF na presença do alelo menos frequente (G), tanto em heterozigotia como em homozigotia. Confirmou-se que a presença do alelo menos frequente destes polimorfismos (G) está associado ao haplótipo Benim, tal como já tinha sido verificado por outros autores [27].

O outro polimorfismo analisado nesta região (rs112479156), que corresponde a uma deleção de 6 nucleótidos, foi submetido ao teste de Shapiro-Wilk para averiguar acerca da normalidade da distribuição da população para este polimorfismo (Tabela 15).

Tabela 15 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs112479156 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* p
sem deleção	37	8,2	4,9	7,4	1,8	22,0	0,018
heterozigotia	13	12,2	8,1	10,0	3,4	27,2	0,047
homozigotia	19	12,7	8,5	9,7	2,3	28,7	0,071
Total	69	10,2	6,9	9,0	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Verificou-se que a amostra não segue uma distribuição normal, pelo que foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, de modo a determinar se existia associação entre este polimorfismo e o nível de HbF (Tabela 16).

Tabela 16 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs112479156

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p^*
sem deleção	37	4,9	7,4	0,107 ¹
heterozigotia	13	8,1	10,0	
homozigotia	19	8,5	9,7	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Após este teste confirmou-se que não existe associação, com significância estatística, entre o genótipo do polimorfismo rs112479156 e o nível de HbF ($p = 0,107$), o que vai contra o que outros autores verificaram, pois estes encontraram a presença desta deleção associada a níveis de HbF $< 5\%$ e verificaram também associação entre a presença desta deleção e o haplótipo Camarões [27], enquanto que no presente estudo não foi encontrado nenhum indivíduo com esse haplótipo.

Dado que não se encontrou significância estatística na associação do genótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis, não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney.

1.5 Caracterização dos polimorfismos em *BCL11A*

1.5.1 Caracterização do polimorfismo rs11886868

A presença do polimorfismo rs11886868, em *BCL11A* no cromossoma 2, neste estudo foi realizada por PCR-RFLP, seguindo o procedimento experimental referido no capítulo de Materiais e Métodos. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs11886868 (Figura 20).

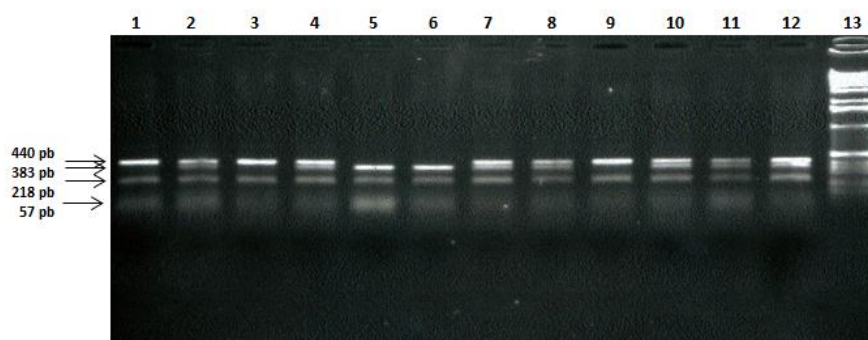


Figura 20 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado do gene *BCL11A* na região do polimorfismo rs11886868, digerido com *Mbo* II. No canal 13 encontra-se o marcador de peso molecular. Nos canais 1, 3 e 9 a enzima não digeriu na região do polimorfismo (genótipo TT); nos canais 2, 4, 7, 8, 10 e 11 digeriu em apenas um dos alelos (genótipo CT); nos canais 5 e 6 digeriu em ambos os alelos (genótipo CC). O canal 12 corresponde ao controlo heterozigótico.

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs11886868 (Tabela 17).

Tabela 17 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs11886868 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF							Shapiro-Wilk* <i>p</i>
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	HbF < 8	HbF ≥ 8	
CC	5	20,2	6,0	22,0	10,1	26,0	0	5	0,196
CT	35	11,2	6,2	10,0	2,3	27,2	12	23	0,028
TT	30	7,8	6,3	6,8	1,8	28,7	21	9	0,000
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	33	37	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

De modo a tornar mais evidente a relação entre o genótipo e o nível de HbF apresenta-se os resultados em forma gráfica (Figura 21).

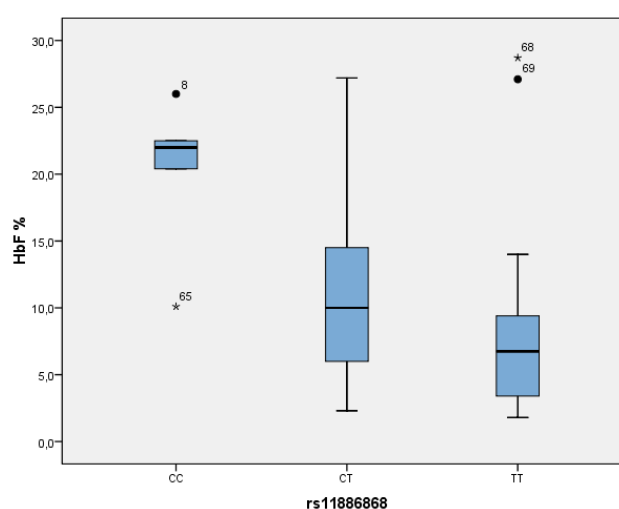


Figura 21 – Gráfico caixa de bigodes com a percentagem de HbF associada a cada genótipo rs11886868. • e * são *outliers* e o nº que lhes está associado corresponde ao nº da amostra.

Como podemos ver no gráfico na presença do polimorfismo rs11886868, genótipo CC, os níveis de HbF são consideravelmente superiores comparativamente a quando este está ausente, genótipo TT. Verificou-se que o aumento do nível de HbF é proporcional ao número de alelos menos frequentes (C). As amostras evidenciadas no gráfico (registadas como ponto ou asterisco) correspondem a amostras com valores de HbF bastante diferentes (*outliers*). Tratam-se de indivíduos que têm um valor de HbF discrepante, muito superior ou muito inferior ao esperado tendo em conta o seu genótipo para o polimorfismo em estudo. A explicação para que tal suceda é o facto do nível de HbF ser influenciado por diversos factores, e apesar de neste polimorfismo em concreto o genótipo ser favorável a níveis elevados de HbF, tal poderá não ocorrer se outros factores com efeito oposto estiverem a actuar.

Podemos observar que no genótipo CC nenhum indivíduo tem HbF < 8% e que a grande maioria dos indivíduos do genótipo TT têm HbF < 8%. Após verificar-se que a amostra não seguia uma distribuição

normal, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 18 A).

Tabela 18 – A: Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs11886868. **B:** Comparações múltiplas entre os genótipos do polimorfismo rs11886868 e os valores de HbF

A

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p^*
CC	5	6,0	22,0	0,001 ¹
CT	35	6,2	10,0	
TT	30	6,3	6,8	

B

Genótipos em comparação		% HbF	
		Diferença das médias	p^*
CC	CT	9,0	0,009 ²
CC	TT	12,5	0,002 ²
CT	TT	3,4	0,005 ²

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

2 Teste de Mann-Whitney

N = nº de indivíduos

Uma vez que se observou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs11886868 e o nível de HbF ($p = 0,001$), tal como verificado por outros autores [32,33], fizeram-se comparações múltiplas, entre os diferentes genótipos para perceber entre quais as diferenças são maiores usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 18 B). Observou-se que as diferenças entre os três genótipos eram estatisticamente significantes, sendo que a diferença entre o genótipo (CC) e o (TT), era a mais realçada ($p = 0,002$).

Os níveis elevados de HbF associados à presença do alelo menos frequente do polimorfismo rs11886868, dever-se-ão ao facto do factor de transcrição BCL11A reprimir a expressão dos genes $G\gamma$ - e $A\gamma$ -globina, que codificam as cadeias γ -globina (constituintes da HbF). Na presença do alelo menos frequente deste polimorfismo a expressão do gene *BCL11A* será inferior e, consequentemente, levará a uma menor repressão dos genes $G\gamma$ - e $A\gamma$ -globina e por sua vez a níveis de HbF superiores.

Uma vez que se verificou significância estatística na associação dos genótipos com o nível de HbF e nas comparações múltiplas entre os genótipos quanto ao nível de HbF, fomos analisar se esse incremento dos níveis de HbF se traduzia numa melhoria do curso clínico da doença. Para tal calculou-se a percentagem da razão das taxas de incidência, como descrito no capítulo Materiais e Métodos. Apresenta-se os cálculos para um genótipo, os outros foram calculados de maneira semelhante.

Começou por calcular-se a Taxa de incidência do genótipo (CC):

$$\text{Taxa de Incidência (CC)} = \frac{n^{\circ} \text{ total de crises (CC)}}{n^{\circ} \text{ total de meses de seguimentos}} = \frac{23}{432} \times 100 = 5,3 \text{ crises por pessoa.mês}$$

Posteriormente calculou-se a razão das taxas de incidência:

$$\text{razão das Taxas de incidência} = \frac{\text{Taxa de Incidência (CC)}}{\text{Taxa de Incidência (TT)}} = \frac{5,3}{13,9} = 0,382$$

Por último calculou-se a percentagem da razão das taxas de incidência:

$$\text{Percentagem da razão das Taxas de incidência} = (1 - \text{razão da Taxa de incidência}) \times 100 = 1 - 0,382 \times 100 = 62\%$$

Observou-se que comparativamente com os indivíduos com genótipo TT, os que tinham o polimorfismo em heterozigotia (CT) tinham um curso clínico 36% mais suave e os que tinham em homozigotia (CC) tinham um curso clínico 62% mais suave. Tal como descrito na literatura este polimorfismo está associado a melhorias bastante evidentes do curso clínico da doença, facto que foi confirmado neste estudo pelo nº de crise por 100 pessoas-mês ser bastante menor.

1.5.2 Caracterização do polimorfismo rs4671393

A presença do polimorfismo rs4671393, em *BCL11A* no cromossoma 2, nesta população, foi estudada seguindo o procedimento experimental de PCR-RFLP descrito no capítulo de Materiais e Métodos. Apresenta-se, em seguida, um resultado representativo obtido para o SNP rs4671393 (Figura 22).

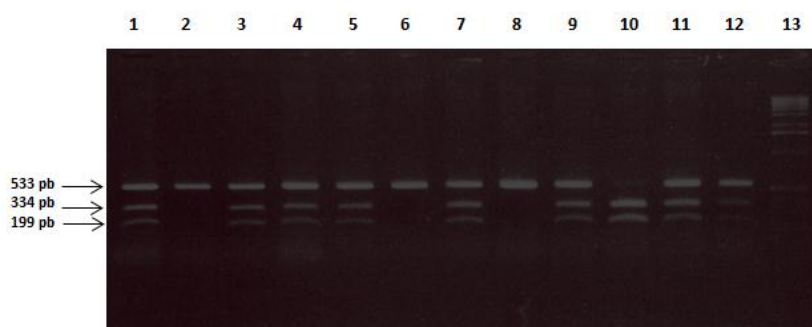


Figura 22 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado do gene *BCL11A* na região do polimorfismo rs4671393, digerido com *Acu* I. No canal 13 encontra-se o marcador de peso molecular. Nos canais 2, 6 e 8 a enzima não digeriu na região do polimorfismo (genótipo GG); nos canais 1, 3, 4, 5, 7, 9 e 11 digeriu em apenas um dos alelos (genótipo AG); no canal 10 digeriu em ambos os alelos (genótipo AA). O canal 12 corresponde ao controlo heterozigótico.

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs4671393 (Tabela 19).

Tabela 19 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs4671393 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF							Shapiro-Wilk* p
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	HbF < 8	HbF ≥ 8	
AA	7	20,5	6,1	22,0	10,1	27,2	0	7	0,537
AG	35	10,4	5,6	9,7	2,3	27,1	13	22	0,060
GG	28	7,7	6,6	6,4	1,8	28,7	20	8	0,000
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	33	37	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

De modo a tornar mais evidente a relação entre o genótipo e o nível de HbF apresenta-se os resultados em forma gráfica (Figura 23).

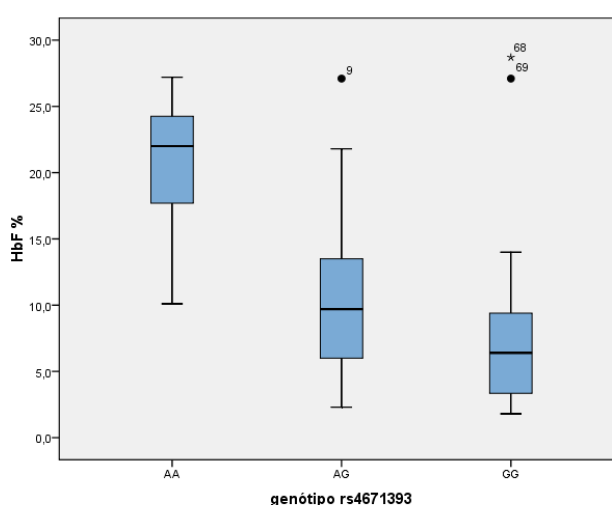


Figura 23 - Gráfico caixa de bigodes com a percentagem de HbF associada a cada genótipo rs4671393. • e * são *outliers* e o nº que lhes está associado corresponde ao nº da amostra.

Na caracterização da população para o polimorfismo rs4671393 verificou-se também discrepância entre a média e a mediana dos níveis de HbF, cuja causa é a presença *outliers*, explicada mais em detalhe anteriormente. Pode observar-se que os indivíduos homozigóticos para o alelo menos frequente (AA) todos eles têm níveis de HbF $\geq 8\%$, enquanto que os homozigóticos para o alelo mais frequente (GG) têm níveis baixos e a sua maioria tem níveis de HbF < 8%. Após verificar-se que a amostra não seguia uma distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 20 A). A presença do alelo menos frequente (A) deste polimorfismo influenciará o aumento do nível de HbF possivelmente pelo mesmo mecanismo explicado o polimorfismo rs11886868. Ou seja, a sua presença tem como consequência a redução da expressão do gene *BCL11A*, o que leva a uma diminuição da síntese do factor repressor BCL11A e, consequentemente, a uma menor repressão e subsequente um aumento da expressão dos genes γ - e α -globina que codificam as cadeias γ -globina constituintes da HbF.

Uma vez que se verificou associação entre o polimorfismo rs4671393 e o nível de HbF ($p < 0,001$), tal como verificado por outros autores [32,33], fizeram-se comparações múltiplas, entre os diferentes genótipos para perceber entre quais as diferenças são maiores usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 20 B). Observou-se que as diferenças entre os três genótipos eram estatisticamente significantes, sendo que a diferença entre o genótipo (GG) e o (AA), era a mais realçada ($p < 0,001$).

Tabela 20 – A: Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs4671393. **B:** Comparações múltiplas entre os genótipos do polimorfismo rs4671393 e os valores de HbF

A

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p^*
AA	7	6,1	22,0	0,000 ¹
AG	35	5,6	9,7	
GG	28	6,6	6,4	

B

Genótipos em comparação		% HbF	
		Diferença das médias	p^*
AA	AG	10,0	0,000 ²
AA	GG	12,7	0,000 ²
AG	GG	2,7	0,010 ²

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

2 Teste de Mann-Whitney

N = nº de indivíduos

Após ter constatado a existência de significância estatística na associação dos genótipos com o nível de HbF e nas comparações múltiplas entre os genótipos quanto ao nível de HbF, foi-se analisar se esse incremento dos níveis de HbF se traduzia numa menor gravidade clínica da doença. Para tal calculou-se a percentagem da razão das taxas de incidência, como explicado no capítulo de Materiais e Métodos. Apresento os cálculos para um genótipo, os outros foram calculados de forma semelhante.

Começou por calcular-se a Taxa de incidência do genótipo (AA):

$$\text{Taxa de Incidência (AA)} = \frac{n^{\circ} \text{ total de crises (AA)}}{n^{\circ} \text{ total de meses de seguimentos}} = \frac{31}{540} \times 100 = 5,7 \text{ crises por pessoa.mês}$$

Posteriormente calculou-se a razão das taxas de incidência:

$$\text{razão das Taxas de incidência} = \frac{\text{Taxa de Incidência (AA)}}{\text{Taxa de Incidência (GG)}} = \frac{5,7}{14,3} = 0,401$$

Por último calculou-se a percentagem da razão das taxas de incidência:

$$\text{Percentagem da razão das Taxas de incidência} = (1 - \text{razão da Taxa de incidência}) \times 100 = 1 - 0,401 \times 100 = 60\%$$

Verificou-se que comparativamente com os indivíduos com genótipo GG, os que tinham o polimorfismo em heterozigotia (AG) tinham um curso clínico 38% mais suave e os que tinham em homozigotia (AA) tinham um curso clínico 60% mais suave. Tal como descrito na literatura este polimorfismo

está associado a melhorias evidentes do curso clínico da doença, dado que foi confirmado neste estudo pelo nº de crise por 100 pessoas-mês ser bastante menor.

1.5.3 Caracterização do polimorfismo rs10189857

A presença do polimorfismo rs10189857, em *BCL11A* no cromossoma 2, nesta população, foi estudada sequenciando a região onde se localiza o polimorfismo, pois não foi encontrada uma enzima de restrição com sequência de reconhecimento na região do polimorfismo. Para tal seguiu-se o protocolo para sequenciação automática descrito no capítulo de Materiais e Métodos. O resultados apresentam-se na Figura 24 A.



Figura 24 – A: Sequenciação parcial do gene *BCL11A* com local polimórfico T/C correspondente ao polimorfismo rs10189857. B: Sequenciação parcial do promotor do gene *BCL11A* com local onde ocorreu uma inserção de um T correspondente ao polimorfismo rs45506594.

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs10189857 (Tabela 21).

Tabela 21 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs10189857 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* p
TT	30	10,8	6,8	9,8	1,8	27,2	0,008
TC	35	9,5	6,8	7,7	1,9	27,1	0,001
CC	5	13,6	9,2	12,4	5,7	28,7	0,224
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Após verificar-se que a amostra não seguia uma distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 22).

Tabela 22 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs10189857

Genótipo	N	% HbF		
		desvio padrão	mediana	p*
TT	30	6,8	9,8	0,364 ¹
TC	35	6,8	7,7	
CC	5	9,2	12,4	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹ Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Após esta comparação confirmou-se que não existe uma relação, com significância estatística, entre o genótipo do polimorfismo rs10189857 e o nível de HbF ($p = 0,364$). Por essa razão não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney. Assim, neste estudo não se confirmou haver associação deste polimorfismo com níveis elevados de HbF como descrito na literatura, numa população de afro-americanos com drepanocitose [29].

A caracterização da população quanto à presença do polimorfismo rs45506594 não constava nos objectivos; no entanto, ao amplificar por PCR a região onde se situava o polimorfismo rs10189857 e depois de sequenciar esse fragmento foi encontrado mais um local polimórfico para além do que inicialmente se pretendia estudar, correspondente a uma inserção de um T. Tal dever-se-á ao facto dos primers escolhidos diferirem dos usados nos outros estudo feitos para caracterizar o polimorfismo rs10189857 (Figura 24 B) [29].

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs45506594 (Tabela 23).

Tabela 23 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs45506594 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Genótipo	N	% HbF					Shapiro-Wilk* p
		média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	
sem inserção	56	10,2	6,7	8,5	1,8	28,7	0,000
heterozigotia	13	11,4	8,4	10,0	1,9	27,2	0,057
homozigotia	1	3,3		3,3	3,3	3,3	
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

No estudo deste polimorfismo pode-se encontrar apenas um indivíduo com a inserção de um T em homozigotia, o que impossibilitou certos testes estatísticos como podemos ver na Tabela 23.

A amostra não segue uma distribuição normal, pelo que foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabela 24).

Tabela 24 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs45506594

		% HbF		
Genótipo	N	desvio padrão	mediana	p*
sem inserção	56	6,7	8,5	0,378 ¹
heterozigotia	13	8,4	10,0	
homozigotia	1		3,3	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹ Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Após esta comparação confirmou-se que não existe uma relação, com significância estatística, entre o genótipo do polimorfismo rs45506594 e o nível de HbF ($p = 0,378$), ver Tabela 24. Dado que não se encontrou significância estatística na associação do genótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis, não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney. Para ser mais correcto na conclusão, o estudo deste polimorfismo deveria ser feito numa população maior, pois segundo este estudo aparenta ser muito raro e numa população pequena não se consegue ter uma estatística sólida. No entanto, devido à sua raridade não parece ser um polimorfismo adequado para ser estudado como modulador da população.

1.6 Caracterização do polimorfismo em *HBS1L-MYB*

A presença do polimorfismo rs9402686, na região intergénica *HBS1L-MYB* no cromossoma 6, nesta população, foi estudada pelo método de PCR-RFLP, seguindo o procedimento experimental descrito no capítulo de Materiais e Métodos (Figura 25).

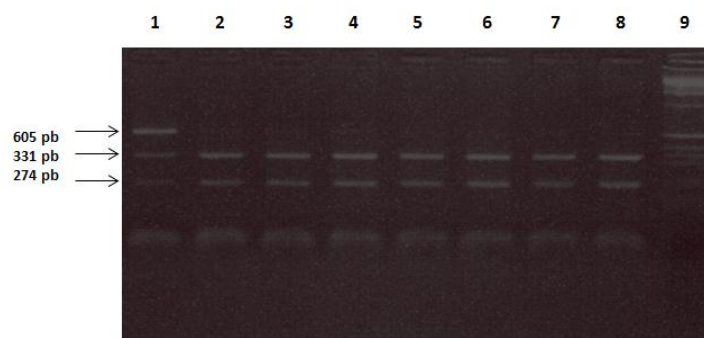


Figura 25 - Gel de electroforese representativo do fragmento amplificado da região intergénica *HBS1L-MYB* na região do polimorfismo rs9402686, digerido com *Bsl* I. No canal 13 encontra-se o marcador de peso molecular. Nos canais 1 a 4 e 6 a 11 a enzima digeriu na região do polimorfismo em ambos os alelos (genótipo GG); no canal 5 digeriu em apenas um dos alelos (genótipo GA). O canal 12 corresponde ao controlo heterozigótico.

Após pesquisa da normalidade da população pelo método de Shapiro-Wilk verificou-se que a população não segue uma distribuição normal para o polimorfismo rs9402686 (Tabela 25).

Tabela 25 - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs9402686 e teste de normalidade de Shapiro-Wilk

		% HbF					
Genótipo	N	média	desvio padrão	mediana	mínimo	máximo	Shapiro-Wilk* <i>p</i>
GG	67	10,2	6,8	9,0	1,8	28,7	0,000
GA	3	14,6	10,0	10,0	7,7	26,0	0,221
AA	0						
Total	70	10,3	7,0	9,1	1,8	28,7	

*Considera-se a distribuição normal, quando $p \geq 0,05$

N = nº de indivíduos

Não foi encontrado nenhum indivíduo com homozigotia para o alelo A e apenas 3 heterozigóticos, o que revela que é muito raro na população em estudo e muito provavelmente na população em geral.

Após verificar-se que a amostra não seguia uma distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis de modo a averiguar se existia associação entre os níveis de HbF e os genótipos deste polimorfismo (Tabela 26).

Tabela 26 - Associação entre o valor de HbF e os genótipos do polimorfismo rs9402686

		% HbF		
Genótipo	N	desvio padrão	mediana	<i>p</i> *
GG	67	6,8	9,0	0,324 ¹
GA	3	10,0	10,0	
AA	0		9,1	

*Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

1 Teste de Kruskal-Wallis

N = nº de indivíduos

Dado que não se encontrou significância estatística na associação do genótipo com os níveis de HbF, através do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,324$), não foram efectuadas as comparações múltiplas entre genótipos dois a dois com o teste de Mann-Whitney.

Neste estudo não se conseguiu confirmar o que tinha sido descrito na literatura [29] em relação à forte associação deste polimorfismo com os níveis de HbF, muito provavelmente devida à amostra ser reduzida e pela raridade do polimorfismo nesta nossa população.

V. Conclusões

Quanto à pesquisa da mutação drepanocítica, que foi realizada com o intuito de confirmar se todos os indivíduos da população em estudo eram homozigóticos para a mutação, verificou-se que dos 108 analisados, dois se revelaram heterozigóticos para a mutação (sendo na realidade talassodrepanocíticos) e um não tinha mutação em nenhum dos alelos. Assim, estas três amostras foram excluídas do estudo pois pretendia-se que este apenas contemplasse indivíduos com a mutação no codão 6 do gene da β -globina em homozigotia. Foram ainda excluídas do estudo amostras por apresentarem critérios de exclusão como a idade ser inferior a três anos, os indivíduos estarem sob tratamento com hidroxiureia ou devido a outras dificuldades na aquisição dos dados clínicos necessários para comparar e relacionar com os resultados obtidos experimentalmente.)

Relativamente à pesquisa da deleção de 3,7 kb que origina Alfa-talassémia, verificou-se na população em estudo uma frequência alélica de 71% para o alelo normal ($\alpha\alpha$) e de 29% para o alelo com a deleção de 3,7 kb ($-\alpha 3,7$), estando de acordo com os valores descritos para uma população com ascendência Africana.

Por um lado pode constatar-se através da análise estatística que não existe uma relação entre a co-herança da Alfa-talassémia com a Drepanocitose e o nível de HbF. Por outro lado, verificou-se que as alterações do perfil hematológico ao nível do VGM, HGM e da Hb total, características de um indivíduo com Alfa-talassémia, mantêm-se quando em co-herança com a Drepanocitose. Confirmaram-se que os indivíduos drepanocíticos que co-herdaram a deleção de 3,7 kb em homozigotia ou em heterozigotia tinham microcitose, hipocromia ao contrário dos indivíduos drepanocíticos sem deleção de 3,7 kb.

Quando tentou relacionar-se a presença da deleção de 3,7 kb com a gravidade clínica da Drepanocitose observou-se que os indivíduos drepanocíticos homozigóticos para a deleção de 3,7 kb eram os que tinham um risco mais elevado de ter mais crises de dor aguda que levassem a internamento. Pelo contrário, e em comparação com os anteriores, observou-se que os heterozigóticos para esta deleção tinham 29% menos de risco de terem crises com internamento e os que não co-herdaram α -talassémia apresentam menos 12% de risco. Concluimos, portanto, que a co-herança da deleção α -talassémica de 3,7 kb confere um efeito benéfico quando em heterozigotia e um efeito nefasto quando em homozigotia.

Relativamente à caracterização do haplótipo no agrupamento génico da β -globina, observou-se uma predominância do haplótipo Bantu seguido do Benim, tal como seria de esperar pois a população é maioritariamente constituída por indivíduos com ascendência Angolana, onde estes são os haplótipos mais comuns. Não se encontrou significância estatística ($p=0,337$) entre o nível de HbF e os diferentes haplótipos, no entanto pôde verificar-se que indivíduos com o haplótipo Senegal tinham tendencialmente os níveis de HbF mais elevados e os do haplótipo Bantu tinham também tendencialmente os mais baixos.

No que diz respeito aos polimorfismos rs112215533, rs112075505 e rs112479156 no promotor de gene G γ -globina, não se observou uma relação entre a presença de cada um dos polimorfismos e o nível de HbF (respectivamente, $p = 0,736$; $0,276$ e $0,107$).

Quanto à caracterização dos polimorfismos em *BCL11A*, verificou-se que para o polimorfismo rs11886868 havia uma associação com significância estatística ($p = 0,001$) entre o nível de HbF e a presença do alelo menos frequente (C). Pôde observar-se que o genótipo associado a níveis de HbF mais baixos era o TT, que os indivíduos TC tinham 36% menos de risco de terem crises com internamento que os TT, e que os CC tinham 62% menos de risco de terem crises com internamento que os TT. Relativamente ao polimorfismo rs4671393 pôde constatar-se que também havia uma associação com significância estatística ($p < 0,001$) entre a presença do alelo menos frequente (A) e o nível de HbF. Verificou-se que o genótipo GG era o que se associava a níveis de HbF mais baixos e que os indivíduos AG tinham 38% menos de risco de terem crises com internamento que os GG, e que os AA tinham 60% menos risco de ter crises com internamento que os GG. No que diz respeito à caracterização da população para a presença dos restantes polimorfismos em *BCL11A*, rs10189857 e rs45506594, pôde constatar-se que não havia associação entre a presença de qualquer um destes polimorfismos e os níveis de HbF (respectivamente $p = 0,364$ e $0,378$)

Relativamente ao polimorfismo rs9402686, na região intergénica *HBS1L-MYB* no cromossoma 6, não se encontrou associação entre o nível de HbF e a presença deste polimorfismo ($p = 0,324$).

Com este estudo pode concluir-se que dos factores genéticos estudados que putativamente modulam o nível de HbF, os que se correlacionam mais fortemente com o nível de HbF são os polimorfismos rs11886868 e rs4671393 em *BCL11A*. Estes polimorfismos causam, provavelmente, uma diminuição na síntese do factor repressor dos genes fetais globínicos, *BCL11A*, o que leva a um aumento da expressão dos genes G γ - e A γ -globina que codificam as cadeias γ -globina constituintes da HbF.

No entanto, são necessários muitos mais estudos para se compreender completamente como são modulados os níveis de HbF e o curso clínico da Drepanocitose.

VI. Perspectivas futuras

Em primeiro lugar, seria interessante ter a oportunidade de realizar estes testes e subsequentes numa população drepanocítica de maior dimensão, de modo a dar mais poder estatístico aos resultados.

Parece importante tentar clarificar a que nível a co-herança de Alfa-talassémia com a Drepanocitose provoca alterações no curso clínico desta, atendendo especificamente às várias manifestações clínicas que sofrem melhorias ou são agravadas.

Seria também interessante averiguar que mais parâmetros para além do número de crises de dor aguda com internamento são afectados pela presença dos polimorfismos rs11886868 e rs4671393 em *BCL11A*, uma vez que se confirmou associação entre estes polimorfismos quer com o nível de HbF quer com o número de crises com internamento. Assim estes polimorfismos genéticos poderiam ser usados como indicadores de prognóstico da gravidade da doença e assim ajustar a terapêutica às necessidades de cada doente.

É também de todo o interesse continuar a pesquisar mais locais polimórficos no agrupamento da β -globina, em *BCL11A*, na região intergénica *HBS1L-MYB* e eventualmente noutros locais, de modo a perceber mais a fundo os diversos factores que influenciam o curso clínico da doença e assim abrir portas a novas terapias mais eficazes para os drepanocíticos.

Queria também referir que parte deste estudo já foi apresentado à comunidade científica na 15ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética Humana, realizada em Lisboa, entre os dias 10-12 de Novembro de 2011, sob a forma de um poster que se pode visualizar no Anexo II. Pretende-se que, após serem esclarecidos os aspectos descritos acima, este trabalho na forma mais alargada, seja publicado sob a forma de um artigo científico.

VII. Bibliografia

- [1] Bain B J. Haemoglobinopathy Diagnosis 2nd edition Blackwell Publishing. 2006
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>. Visualizado a 5 de Janeiro de 2011
- [3] <http://doctorgrasshopper.wordpress.com/tag/hemoglobin/> Visualizado a 6 de Janeiro de 2011
- [4] <http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html>. Visualizado a 6 de Janeiro de 2011
- [5] Stamatoyannopoulos G. Control of Globin Gene Expression During Development and Erythroid Differentiation. *Exp. Hematol.* 2005; 33:259–271.
- [6] Sankaran V G, Xu J, Orkin S H. Advances in the Understanding of Haemoglobin Switching. *Br J Hematol.* 2010; 149:181–194
- [7] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1377/> Visualizado a 5 de Janeiro de 2011
- [8] Driss A, Asare K O, Hibbert J M, Gee B M, Adamkiewicz T V, Stiles J K. Sick Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:23–48.
- [9] Ashley-Koch A, Yang Q, Olney R S. Sick Hemoglobin (Hb S) Allele and Sick Cell Disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2000; 151:839-845
- [10] Rees D C, Williams T N, Gladwin M T. Sick-cell Disease. *Lancet.* 2010; 376:2018–31
- [11] Booth C, Inusa B, Obaro S K. Infection in sick cell disease: A review. *Int J Infect Dis.* 2010; 14:2—12
- [12] Morris C R. Mechanisms of Vasculopathy in Sick Cell Disease and Thalassemia. *Am Soc Hematol.* 2008:177-185
- [13] http://rappagesmagazine.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1940:sickle-cell-what-african-americans-needs-to-know-&catid=52:mind-ya-business&Itemid=81. Visualizado a 9 de Janeiro de 2011
- [14] Martins M, Olim G, Melo J, Magalhães H, Rodrigues M. Hereditary Anaemias in Portugal: Epidemiology, Public health significance and control. *J Med Genet.* 1993; 50:235-239.
- [15] Lavinha J, Faustino P, Gonçalves J, Almeida L, Peres M, Martins M, Labie D. Importation Route of Sick Cell Trait in Portugal: Contribution of Molecular Epidemiology. *The great maritime discoveries and world health.* 1991:211-215
- [16] Thein S L, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of Fetal Hemoglobin: New Insights Emerging From Genomics and Clinical Implications. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:216–R223
- [17] Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genet Med.* 2011; 13:83-88
- [18] Wambua S, Mwacharo J, Uyoga S, Macharia A, Williams T N. Co-inheritance of α^+ -thalassemia and Sick Trait Results in Specific Effects on Haematological Parameters. *Br J Hematol.* 2006; 133:206-209

- [19]Belisário A R, Rodrigues C V, Martins M L, Silva C M, Viana M B. Coinheritance of α -thalassemia Decreases the Risk of Cerebrovascular Disease in a Cohort of Children With Sickle Cell Anemia. *Hemoglobin*. 2010; 34:516-529
- [20]Gill F M, Sleepr L A, Weiner S J, Brown A K, Bellevue R, Grover R, Pegelow C H, Vichinsky E. Clinical Events in the First Decade in a Cohort of Infants With Sickle Cell Disease. *Blood*. 1995; 86: 776-783
- [21]Sankaran V G, Menne T F, Xu J, Akie T E, Lettre G, Handel B V, Mikkola H K A, Hirschhorn J N, Cantor A B, Orkin S H. Human Fetal Hemoglobin Expression is Regulated by the Developmental Stage-Specific Repressor BCL11A. *Science*. 2008; 332:1839-1842
- [22]Costa V A, Acedo M J, Polimeno N C, Bertuzzo C S. Contribuição para a Estimativa da Frequência Populacional da Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002; 18: 1469-1471
- [23]Thein S L, Menzel S. Discovering the Genetics Underlying Foetal Haemoglobin Production in Adults. *Br J Hematol*. 2009; 145: 455-467
- [24]Steinberg M H. Predicting Clinical Severity in Sickle Cell Anemia. *Br J Hematol*. 2005; 129: 465-481
- [25]Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin C T, Sebastiani P, Chui D H K, Steinberg M H. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia. *Blood*. 2011; 118: 19-27
- [26]Powars D, Weiss J N, Chan L S, Schroeder W A. Is There a Threshold Level of Fetal Hemoglobin That Ameliorates Morbidity in Sickle Cell Anemia?. *Blood*. 1984; 63: 921-926
- [27]Barbosa C G, Gonçalves-Santos N J, Souza-Ribeiro S B, Moura-Neto J P, Takahashi D, Silva D O, Hurtado-Guerrero A F, Reis M G, Gonçalves M S. Promotor Region Sequence Differences in A and G Gamma Globin Genes of Brazilian Sickle Cell Anemia Patients. *Braz J Med Biol Res*. 2010; 43: 705-711
- [28]Sampietro M, Thein S L, Contreras M, Pazmany L. Variation of HbF and F-cell Number With the G-gamma XmnI (C-T) Polymorfism in Normal Individuals. *Blood*. 1992; 79: 832-833
- [29]Galarneau G, Palmer C D, Sankaran V G, Orkin S H, Hirschhorn J N, Lettre G. Fine-Mapping at Three Loci Known to Affect Fetal Hemoglobin Levels Explains Additional Genetic Variation. *Nature Genetics*. 2010; 42: 1049-1051
- [30]Xu J, Vijay G, Sankaran V G, Ni M. Transcriptional Silencing of γ -globin by BCL11A Involves Long-range Interactions and Cooperation with SOX6. *Genes Dev*. 2010; 24: 783-798
- [31]Green N S, Barral S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 56: 177-181
- [32]Lettre G, Sankaran V G, Bezerra M A C, Araújo A S, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa F F, Hirschhorn J N, Orkin S H. DNA Polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin Loci Associate with Fetal Hemoglobin Levels and Pain Crises in Sickle Cell Disease. *PNAS*. 2008; 105:11869–11874

- [33]Makani J, Menzel S, Nkya S, Cox S E, Drasar E, Soka D, Komba A N, Mgaya J, Rooks H, Vasavda N, Fegan G, Newton C R, Farrall M, Thein S L. Genetics of Fetal Hemoglobin in Tanzanian and British Patients With Sickle Cell Anemia. *Blood*. 2011; 117: 1390-1392
- [34]Thein S L, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, Silver N, Gerovasilli A, Ping C, Yamaguchi M, Wahlberg K, Ulug P, Spector T D, Garner C, Matsuda F, Farrall M, Lathrop M. Intergenic Variants of *HBS1L-MYB* Are Responsible for a Major Quantitative Trait Locus on Chromosome 6q23 Influencing Fetal Hemoglobin Levels in Adults. *PNAS*. 2007; 104: 11346-11351
- [35]Menzel S, Jiang J, Silver N, Gallagher J, Cunningham J, Surdulescu G, Lathrop M, Farrall M, Spector T D, Thein S L. The *HBS1L-MYB* intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood*. 2007; 110:3624-3626
- [36]Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, Lathrop M, Thein S L, Best S. The *HBS1L-MYB* intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*. 2009; 114:1254-1262
- [37]Beutler E, West C. Hematologic Differences Between African-Americans and Whites: The Roles of Iron Deficiency and α -thalassemia on Hemoglobin Levels and Mean Corpuscular Volume. *Blood*. 2005; 106:740-745

VIII. Anexos

Anexo I

Tabela A.1 - Oligonucleótidos iniciadores usados nas reacções de PCR para pesquisa da mutação drepanocítica e da deleção – α 3,7

Nome	Temperatura de <i>melting</i> (tm)	Sequência
1	66°C	ACCTCACCTGTGGAGCCAC
67	81°C	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC
A 5' UTR F2	59,2°C	GGGATGCACCCACTGGCACT
A2 3' UTR R1	63,9°C	CTCCATTGTTGGCACATTCCGGG
A1 3' UTR R1	63,1°C	CTGCTGTCCACGCCCATGCC

Tabela A.2 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene Gy-globina para posterior ser efectuada sequenciação

<i>Xmn</i> I (Gy)					
Oligonucleótidos iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50µL)	µL	Condições de PCR
Directo	GCACTGAACTGTTGCTTTATAGGAT	55,7°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10m/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 40seg Annealing: 57°C 40seg Extensão: 72°C 50seg
			O.I. directo (25pmol/µL)	1	
Reverso	TGGCGTCTGGACTAGGAGCTTATT	59,5°C	O.I. inverso (25pmol/µL)	1	Extensão final: 72°C 10 min
			Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	
			H ₂ O bidestilada	40,1	Pausa: 4°C
			DNA molde	1	

Tabela A.3 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene Gy-globina posterior digestão com a enzima *Hind* III

<i>Hind</i> III (Gy)					
Oligonucleótidos iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50µL)	µL	Condições de PCR
Directo	AGTGCTGCAAGAAGAACAACCTACC	57,5°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10m/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 40seg Annealing: 57°C 40seg Extensão: 72°C 50seg
			O.I. directo (25pmol/µL)	1	
Reverso	CTGTGACCAGTCTGTAGACTTAAG	54,4°C	O.I. inverso (25pmol/µL)	1	Extensão final: 72°C 10 min
			Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	
			H ₂ O bidestilada	40,1	Pausa: 4°C
			DNA molde	1	

Tabela A.4 - Mistura e condições de PCR para amplificação do gene $\text{A}\gamma$ -globina para posterior digestão com a enzima *Hind* III

<i>Hind</i> III ($\text{A}\gamma$)					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50 μ L)	μ L	Condições de PCR
Directo	GACTAGTGCTTGAAGGGGAACAAC	57,7°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10m/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 40seg <i>Annealing</i> : 60°C 40seg
			O.I. directo (25pmol/ μ L)	1	
Reverso	CCTCTGCTGATTCATTTCTTACAC	53,8°C	O.I. inverso (25pmol/ μ L)	1	Extensão: 72°C 50seg
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.5 - Mistura e condições de PCR para amplificação da região 5' do gene $\Psi\beta$ -globina para posterior digestão com a enzima *Hinc* II

<i>Hinc</i> II (5' $\Psi\beta$)					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50 μ L)	μ L	Condições de PCR
Directo	TCCTATCCATTACTGTTCTTGAA	53,4°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10m/mL)	0,7	
			dNTP's	1	32X Desnaturação: 94°C 1 min <i>Annealing</i> : 61°C 1 min
			O.I. directo (25pmol/ μ L)	1	
Reverso	ATTGTCTTATTCTAGAGACGATTT	49,6°C	O.I. inverso (25pmol/ μ L)	1	Extensão: 72°C 1'30 min
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.6 - Mistura e condições de PCR para amplificação da região 3' do gene $\Psi\beta$ -globina para posterior digestão com a enzima *Hinc* II

<i>Hinc</i> II (3' $\Psi\beta$)					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50 μ L)	μ L	Condições de PCR
Directo	GTACTCATACTTTAAGTCCTAACT	49,5°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10m/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 40seg <i>Annealing</i> : 60°C 40seg
			O.I. directo (25pmol/ μ L)	1	
Reverso	TAAGCAAGATTATTCTGGTCTCT	51,7°C	O.I. inverso (25pmol/ μ L)	1	Extensão: 72°C 50seg
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.7 - Mistura e condições de PCR para amplificação de uma região a 3' do gene β -globina para posterior digestão com a enzima *Hinf* I

<i>Hinf</i> I (3' β)						
Oligonucleótidos iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50 μ L)	μ L	Condições de PCR	
Directo	GGGCCTATGATAGGGTAAT	50,5°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTP's	1	30X	Desnaturação: 94°C 40seg
			O.I. directo (25pmol/ μ L)	1		Annealing: 57°C 40seg
Reverso	TGGATTCTGCCTAATAAAA	45,9°C	O.I. inverso (25pmol/ μ L)	1	Extensão: 72°C 50seg	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min	
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1	Pausa: 4°C	

Tabela A.8 - Tamanhos dos fragmentos de DNA digeridos e não digeridos pelas respectivas enzimas

		<i>Hind</i> III (G γ)	<i>Hind</i> III (A γ)	<i>Hinc</i> II (5' Ψ β)	<i>Hinc</i> II (3' Ψ β)	<i>Hinf</i> I (3' β)
Tamanho do fragmento (Pb)	Não digerido no sítio do SNP	788	776	794	914	341
		274 *	228*			244*
	Digerido no sítio do SNP	697	681	687	480	213
		91	95			128
		274*	228*	107	434	244*
						154*

* Fragmentos originados após clivagem pelas enzimas, independentes do presença ou não do polimorfismo. São fragmentos constantes que servem como controlos positivos da digestão

Tabela A.9 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa o *SNP* rs11886868

rs11886868						
Oligonucleótidos iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50 μ L)	μ L	Condições de PCR	
Directo	GGCTAGAGTCTTGAGGAGACCC	58,8°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min	
			BSA (10mg/mL)	0,7		
			dNTP's	1	30X	Desnaturação: 94°C 1 min
			O.I. directo (25pmol/ μ L)	1		Annealing: 58°C 1 min
Reverso	GGGCTCCCTGGACTIONAACTC	59,8°C	O.I. inverso (25pmol/ μ L)	1	Extensão: 72°C 1 min	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min	
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1	Pausa: 4°C	

Tabela A.10 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa o *SNP* rs10189857

rs10189857					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50µL)	µL	Condições de PCR
Directo	GTCATTCTCTGGAAAGGAGCC	55,4°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10mg/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 1 min Annealing: 58°C 40 seg
			O.I. directo (25pmol/µL)	1	
Reverso	GATCCCATCACCAGATAGCTC	50,1°C	O.I. inverso (25pmol/µL)	1	Extensão: 72°C 1 min
			Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.11 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa o *SNP* rs4671393

rs4671393					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50µL)	µL	Condições de PCR
Directo	CCTTCCTTTAATCAGCTTCCGCC	58,1°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10mg/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 1 min Annealing: 62°C 50 seg
			O.I. directo (25pmol/µL)	1	
Reverso	GCTATCTGTTTGGCTCAGCTACCA	56,6°C	O.I. inverso (25pmol/µL)	1	Extensão: 72°C 1 min
			Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.12 - Mistura e condições de PCR para amplificação do fragmento onde se situa o *SNP* rs9402686

rs9402686					
Oligonucleótidos iniciadores		T _m	Mistura de reacção (volume final de 50µL)	µL	Condições de PCR
Directo	CATAGGCCAGGGATCACCATGG	59,7°C	Tampão PCR	5	Desnaturação inicial: 94°C 5 min
			BSA (10mg/mL)	0,7	
			dNTP's	1	30X Desnaturação: 94°C 1 min Annealing: 64°C 1 min
			O.I. directo (25pmol/µL)	1	
Reverso	GCCTGGGAATGGCCCC	55,6°C	O.I. inverso (25pmol/µL)	1	Extensão: 72°C 1 min
			Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	Extensão final: 72°C 10 min
			H ₂ O bidestilada	40,1	
			DNA molde	1	Pausa: 4°C

Tabela A.13 - Mistura, condições de PCR e fragmentos obtidos após digestão enzimática dos fragmentos onde se situam os polimorfismos rs11886868, rs4671393 e rs 9402686

SNP	Enzima de restrição	Sequência reconhecida	Base	Clivagem	Mistura reaccional	Protocolo (20µL)	Temperatura/ tempo	Fragmentos obtidos (pb)
rs11886868	Mbo II	5'...AGAAGAN ₈ ...3' 3'...TCTTCTN ₇ ...5'	C	+	Tampão NEB 4 (10X)	2µL	37°C/≥4h	440
					Mbo II 5U/µL	1µL		383
			T	-	Água estéril	7µL		218
					Produto de PCR	10µL		57
rs4671393	Acl I	5'...CTGAAG(N) ₁₅ ...3' 3'...GACTTC(N) ₁₄ ...5'	C	-	Tampão NEB 4 (10X)	2µL	37°C/≥4h	533
					Acl I 5U/µL	1µL		334
			T	+	Água estéril	7µL		199
					Produto de PCR	10µL		
rs9402686	Bsl I	5'...CCNNNNNNNNGG...3' 3'...GGNNNNNNNNCC...5'	A	-	Tampão NEB 3 (10X)	2µL	55°C/≥4h	605
					Bsl I 10U/µL	0,5µL		331
			G	+	Água estéril	7,5µL		274
					Produto de PCR	10µL		

Tabela A.14 - Mistura e condições de PCR para sequenciação automática de DNA

Mistura de reacção (volume final de 10µL)	µL	Condições de PCR	
Tampão Big Dye®	3,5	Desnaturação inicial: 96°C 1 min	
Big Dye®	0,5	30 X	Desnaturação: 96°C 10 seg
O.I. (25pmol/µL)	1		Annealing: 53°C 5 seg
H ₂ O bidestilada	3		Extensão: 60°C 4 min
Produto de PCR	2		

Tabela A.15 – Caracterização das população para alguns dos parâmetros analisados

Nº amostra	Idade (anos)	sexo	Nº de crises com internamento	Nº de meses com acompanhamento	Hb (g/dL)	VGM (fl)	HGM (pg)	HbF (%)	Haplótipo	Alfa talassémia (-α3,7)
1	22	M	0	78	8,9	85,6	30,5	9,8	Bantu/Benim	αα/αα
2	16	F	3	90	7,4	77,2	27,3	5,7	Bantu/Bantu	αα/-α3,7
3	11	M	1	78	8,0	76,6	26,2	19	Bantu/Atípico	αα/-α3,7
4	4	M	10	30	9	78,5	27,5	23	Bantu/Benim	αα/αα
5	16	F	1	54	7,2	84,7	29,1	3,8	Bantu/Atípico	αα/αα
6	8	M	3	36	7,5	88,1	28,2	9,4	Benim/Benim	αα/αα
7	6	M	8	48	8,9	64	22,1	22	Senegal/Senegal	αα/-α3,7
8	14	M	6	126	9,3	82,4	28,8	26	Bantu/Senegal	αα/-α3,7
9	4	M	2	54	9,9	80	27,8	27	Senegal/Senegal	αα/αα
10	12	F	4	78	7,5	83,1	29	3,9	Benim/Benim	αα/αα
11	11	F	0	36	8	82,5	25,5	9,7	Benim/Benim	-α3,7/-α3,7
12	8	M	2	42	7,2	94,3	31,3	13	Bantu/Bantu	αα/αα
13	7	F	11	72	8,8	76,6	25,9	12	Bantu/Benim	αα/-α3,7

14	7	M	9	90	8,7	79,1	27,1	16	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
15	13	F	11	138	7	80,4	28,1	3	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
16	9	M	5	66	8,5	66	22	5,8	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
17	18	M	6	180	8,3	84,4	29,5	9,2	Benim/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
18	19	F	3	18	7,1	95,5	31,2	3,3	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
19	7	F	2	30	8,1	83,2	26,8	27	Bantu/Benim	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
20	7	F	15	60	8,6	63,6	21,3	12	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
21	8	F	2	36	9,1	88,3	30,5	16	Benim/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
22	19	F	17	42	7,5	74,9	24,8	2,8	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
23	12	F	2	30	6,7	87,4	28,3	2,3	Benim/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
24	16	F	5	6	7,2	88,7	30,6	12	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
25	18	M	19	102	7,8	78	28	3	Benim/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
26	16	F	22	144	9,4	90,1	32,2	18	Senegal/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
27	13	F	6	30	7,6	82	28	8	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
28	10	M	3	90	8,4	79,4	26,1	14	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
29	6	M	3	18	7,2	93,2	30,2	5,8	Benim/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
30	7	M	9	72	8	65,6	21,8	5	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
31	5	M	1	60	9,8	54	18,7	22	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
32	14	F	6	48	8,9	78,6	27,1	15	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
33	17	F	1	30	8,3	76,3	26	9,4	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
34	15	F	5	126	8,7	64,3	21,7	9,8	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
35	11	F	2	90	7,5	75	25,6	11	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
36	11	F	28	126	7,6	73	23	5	Bantu/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
37	17	F	38	132	9,1	83,4	28,9	7,8	Bantu/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
38	10	F	9	90	8,5	74,5	25	10	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
39	9	F	6	102	8,3	70,2	23,2	6	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
40	12	M	5	114	7,5	73,9	23,3	20	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
41	6	F	4	36	7,5	82	26,2	7,5	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
42	12	M	18	108	8,8	69	22	4,6	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
43	6	M	19	72	7,5	74,3	25,8	7,2	Bantu/Benim	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
44	11	M	4	84	8,3	70,4	23,5	1,8	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
45	9	M	11	96	8,3	80,8	28,8	3,4	Bantu/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
46	11	M	6	78	7,2	78,1	26,3	15	Senegal/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
47	7	M	1	24	7,7	67,4	23,5	11	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
48	10	M	13	84	7,2	84	26	7,4	Bantu/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
49	17	M	0	48	7,8	66,7	22	2	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
50	7	M	1	36	7,1	82,3	27	6,5	Senegal/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
51	4	M	3	24	7	85,1	24,7	7,4	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
52	4	M	5	24	7,4	82	24,5	7,4	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
53	18	F	2	36	7,9	93,2	33,7	14	Benim/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
54	10	F	3	72	8,4	58,3	19	6	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
55	5	M	4	54	7,6	67	22	7,7	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
56	18	M	4	12	9,9	69,3	23,1	13	Senegal/Senegal	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
57	9	M	5	60	7,7	70,4	23,8	3,3	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
58	16	F	3	30	9,1	84	31	7	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

59	9	M	22	102	6,9	81,1	27,8	4,7	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
60	8	M	8	90	7,1	79,3	28,5	4	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
61	11	M	16	138	7,3	75,3	26,4	5	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/-\alpha3,7$
62	8	F	3	30	6,6	78,4	24,6	14	Bantu/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
63	6	M	5	36	7,1	77,1	26,1	11	Bantu/Atípico	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
64	8	F	26	90	8	59,6	19,5	9	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
65	11	F	1	102	7,9	79	26	10	Bantu/Bantu	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
66	15	F	5	96	8,1	89,8	31,8	10	Bantu/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
67	11	M	14	18	7,6	77	26	1,9	Bantu/Bantu	$-\alpha3,7/-\alpha3,7$
68	13	F	0	12	8,3	83	29	29	Benim/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
69	4	F	4	54	9,6	82,7	28,9	27	Benim/Benim	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
70	14	M	8	150	7,5	77,6	25,8	4	Senegal/Senegal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

THE EFFECT OF GENETIC POLYMORPHISMS IN TRANS-ACTING FACTOR GENES AS MODULATORS OF FETAL HEMOGLOBIN LEVEL IN SICKLE CELL DISEASE

Andreia Coelho¹, Armandina Miranda², Emanuel Ferreira³, Paula Faustino⁴

¹Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa.
²Departamento de Prática de Saúde e Ciências Clínicas, INSA, Lisboa.



Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge

INTRODUCTION

Sickle Cell Anemia (SCA), one of the most common autosomal recessive hereditary anemia, is caused by a mutation in the β -globin gene (HBB:c.20A>T) on 11p15.5. This originates a hemoglobin variant named HbS, as opposed to the normal adult HbA. HbS ability to polymerize when deoxygenated gives rise to abnormal sickled red blood cells (Fig.1).

The two major SCA manifestations are chronic hemolysis and recurrent vaso-occlusive episodes^[1]. However, the clinical phenotype of SCA is heterogeneous, ranging from relatively mild to severe due to the modifying effect of both environmental and genetic factors^[2, 3].

The level of fetal hemoglobin (HbF) is a known modifier of the disease severity^[4] and its variability among SCA patients has been associated with polymorphisms in both globin cis-acting elements (e.g. the XmnI SNP, upstream HBG2)^[5, 6] and in non-globin trans-acting factors (e.g. BCL11A and HBS1L-MYB intergenic region)^[7].

In this study, we aimed to contribute to a better understanding of the non-globin genetic factors modulating the expression level of HbF in SCA.



Fig. 1. Normal red blood cells and a sickled one.

METHODS

We genotyped (by PCR-RFLP) 110 SCA patients for the SNP rs11886868 located in intron 2 of the BCL11A gene (2p16.1). Also, 79 SCA patients were screened for two other SNPs located in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6 (rs4895441 and rs6929404).

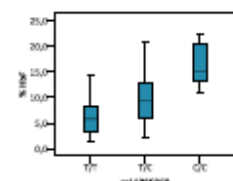
A normality test (K-S test) was applied to our sample and a normal statistical distribution of our dependent variable (%HbF) was not excluded. Therefore, we performed an ANOVA to assess whether there were differences in %HbF distribution among the possible genotypes of all SNPs. Multiple comparisons were performed with the Bonferroni test.

Patients were also divided in two groups, one with HbF<8% and other with HbF≥8%, and genotypic and allelic frequencies were compared between both using the Chi-square test of independence. All statistical analysis were performed with SPSS v17 statistical software.

RESULTS

BCL11A – SNP rs11886868

1. We found statistical significant differences between the three genotypes of SNP rs11886868 regarding %HbF distribution. This result reveals a strong association of this SNP with HbF levels.



rs11886868	N	Mean HbF (%)	Median HbF (%)	p value*
T/T	51	6,1	5,8	<0.001 [†]
T/C	50	9,4	9,3	
C/C	9	16,5	15,0	

* Statistical significance considered at p<0.05.
[†] ANOVA analysis.

2. The reciprocal analysis further confirms this result (genotypic and allelic frequencies are differentially distributed between the low and high HbF groups).

BCL11A (rs11886868) (110 SCA patients)									
Low HbF (<8%) (35 patients)					High HbF (≥8%) (35 patients)				
Mean	Median	Max.	Min.		Mean	Median	Max.	Min.	
4,6	4,7	7,7	1,5		12,3	11,0	22,5	8,0	

rs11886868	Low HbF (<8%)	High HbF (≥8%)	p value*
Genotypic frequencies			
TT	35	16	<0.001†
TC	20	30	
CC	0	9	
Allelic frequencies			
T	90	62	<0.001†
C	20	48	

* Statistical significance considered at p<0.05.
[†] Chi-square test of independence.

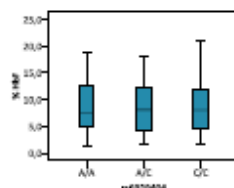
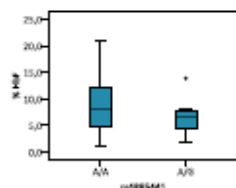
3. After multiple comparison analysis we were able to determine that the genotypes with at least one C allele were strongly associated with higher HbF percentages.

Genotypes	Mean difference (HbF %)	p value*
T/T C/T	-3,3	<0.001 [†]
T/T C/C	-10,4	<0.001 [†]
C/T C/C	-7,1	<0.001 [†]

* Statistical significance considered at p<0.05.
[†] Bonferroni test.

HBS1L-MYB – SNPs rs4895441 and rs6929404

1. No association was found between genotypes and HbF level distribution.



rs4895441	N	Mean HbF (%)	Median HbF (%)	p value*
A/A	72	8,8	8,2	0.306 [†]
A/G	7	6,8	6,7	
G/G	0	-	-	

rs6929404	N	Mean HbF (%)	Median HbF (%)	p value*
A/A	11	8,9	7,5	0.964 [†]
A/C	38	8,7	8,1	
C/C	30	8,5	8,0	

* Statistical significance considered at p<0.05.
[†] T Test; [†] ANOVA analysis.

CONCLUSIONS

• We observed, in this group of SCA patients, a strong association of SNP rs11886868 in BCL11A gene with higher levels of HbF (p<0.001). BCL11A factor functions as a repressor of γ -globin genes expression, in cooperation with other co-factors^[8] (Fig.2). The SNP rs11886868 probably impairs normal BCL11A gene expression, decreasing its ability to silence γ -globin genes, which leads to increased HbF levels in the adult life.

• MYB factor is also thought to be a potent negative regulator of HbF expression (Fig. 2). However, we didn't observe association of SNPs rs4895441 and rs6929404 located within the HBS1L-MYB intergenic region with the level of HbF.

• The results gathered in this study confirm that genetic polymorphisms in some trans-acting factor genes can modulate the HbF level in SCA, with consequences in its pathophysiology. This knowledge may provide new insights for the development of new therapeutic strategies for this pathology.



Fig. 2. Schematic representation of BCL11A/MYB mediated silencing of γ -globin genes. Adapted from Xu J et al. (2010) [9].

References

1. Steinberg MH (2004) The Scientific World Journal, 1(2):88-1024
2. Kallan SL, MPT S (2010) Am J Hematol, 85:4-13
3. Oros A, Acero R, et al. (2008) Genetica 116:23-48
4. Steinberg M, Hershkov A, et al. (2011) JAMA 305:10-27
5. Lottin O, Serres M, et al. (2008) PNAS, 105(25): 12881-12886
6. Serres M, Serres M, et al. (2010) Proc Natl Acad Sci USA, 107(10): 11700-11705
7. Xu J, Serres M, et al. (2010) Blood, 116(10): 2470-2478

Partially funded by FCT/PCIT/BDP/2007 and Programa de Financiamento Científico do CDRH